

Untersuchungen zur DNS - Verpackung
beim Salmonella Phagen P 22

Elisabeth Strobel

1981

Untersuchungen zur DNS-Verpackung
beim Salmonella-Phagen P22

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Elisabeth Strobelt
aus
Augsburg
1981

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1977 bis August 1980 am Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Horst Schmieger durchgeführt.



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Schmieger
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfhard Bandlow
- Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1981

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	18
1. Bakterienstämme	18
2. Bakteriophagen	18
3. Medien	19
4. Puffer und Lösungen	20
5. Chemikalien und Enzyme	23
6. Methoden	24
C. ERGEBNISSE	40
I. Entwicklung eines in vitro-Systems zur Verpackung von DNS	40
1. Verpackungsversuche mit einem Extrakt als DNS-Donor	40
1.1. Experimenteller Ansatz	40
1.2. Geeignete Mutanten	41
1.3. Aufschluß der Extrakte	42
2. Illegitime Vermehrung der background- Phagen	46
2.1. Auftreten der background-Phagen	46
2.2. Einfluß der background-Phagen auf die Auswertung der Versuche	47
2.3. Einfluß der Inkubationsdauer auf den Titer der background-Phagen	49
2.4. Versuch, den Titer der background-Phagen zu senken	50
3. Verpackung exogener DNS	53
3.1. Experimenteller Ansatz	53
3.2. Anforderungen an die DNS	53
3.3. Gewinnung der DNS	56
3.4. Verpackungsexperimente	58
4. Zusammenfassung	62

II. Optimierung des Verpackungsansatzes	63
1. Qualität der Extrakte	63
1.1. Inkubationszeit	63
1.2. Inkubationstemperatur	65
1.3. Konzentration der Extrakte	66
1.4. Zerstörung der Extrakt-DNS	71
1.5. Bakterieller Wirt für die Extrakterstellung	73
2. Dauer der Verpackungsreaktion	73
3. Optimierung weiterer Komponenten der Verpackungsreaktion	75
3.1. ATP	75
3.2. Mg-Ionen	75
3.3. Polyamine	77
3.4. Qualität der DNS-Präparation	78
3.5. Begrenzte Vergleichbarkeit der absoluten Ergebnisse	80
4. Zusammenfassung	81
III. Untersuchungen zur Funktion der Gene, die an der Reifung des Phagen P22 beteiligt sind	82
1. gp 10,16, 20,26	83
2. DNS-Verpackungsmutanten	85
2.1. Versuche zu gp1	85
2.2. Versuche zu gp2	89
2.3. Versuche zu gp3	91
3. Versuche zu den Kopfgenen 5 und 8	96
4. Zusammenfassung	97
IV. Untersuchungen zur Struktur und Länge von DNS-Molekülen als Voraussetzung für eine Verpackung	98
1. Verpackung von DNS aus Infektionen mit am-Mutanten	98
1.1. Untersuchungen mit Hilfe von Gel-Elektrophorese	98
1.2. Elektronenoptische Untersuchungen	103

2.	Verpackung reifer DNS	109
2.1.	Vergleich der Verpackung reifer DNS mit der von DNS aus amber-Infektionen	109
2.2.	Rekombination mit Extrakt-DNS findet nicht statt	112
2.3.	Versuch, die Struktur der DNS-Moleküle, die verpackt werden, zu klären	114
3.	Zusammenfassung	118
V.	Bestimmung der Dichte des Phagen L und der P22-L-Hybride	119
1.	Dichte der Phagen	120
2.	Dichte der in vitro-Phagen	124
VI.	Charakterisierung der DNS, die im Verpackungsexperiment eingesetzt wird	128
1.	Charakterisierung der reifen DNS	128
1.1.	Analyse mit Eco RI	129
1.2.	Molekulargewichte der verschiedenen Hybrid-Phagen und L	135
1.3.	Molarer Anteil einiger der Eco RI-Fragmente von L und den Hybriden	142
2.	Analyse der DNS aus Infektionen von end ⁻ - bzw. LT2-Zellen mit am-Mutanten mit der Restriktionsnuklease Eco RI	147
2.1.	P22-L -Hybride	148
2.2.	P22-am-Mutanten	148
3.	Anteil von P22 und L in den Hybriden	154
4.	Zusammenfassung	160
D.	DISKUSSION	161
E.	ZUSAMMENFASSUNG	185
F.	LITERATURVERZEICHNIS	186

Verwendete Abkürzungen

Mutanten:

2·L	am2 c ^L I ^{P22}
2·13·L	am2 am13 c ^L I ^{P22}
3·L	am3 c ^L I ^{P22}
5·13·L	am5 am13 c ^L I ^{P22}

reifeDNS:DNS, die in einem reifen Phagen enthalten ist

headfull:Menge der DNS, die in einen Phagenkopf

paßt

A. Einleitung

Die Viren sind zweifellos die Strukturen, die am einfachsten auf molekularer Ebene zu untersuchen sind, um so ihren Aufbau und ihre Entwicklung zu erklären. Unter ihnen gehören einige Bakteriophagen zu den best untersuchten. Ein Schritt näher an das Verständnis des Mechanismus eines komplizierten biochemischen Prozesses wie die Virusentwicklung ist, solch einen Prozess mit gereinigten Komponenten zu rekonstruieren, ihn in vitro ablaufen zu lassen. Beginn dieser Forschungen auf diesem Wege war der Zusammenbau eines infektiösen TMV (Tabak Mosaik Virus) aus Makromolekülen, nachdem es zunächst in seine Einzelbausteine, die Nukleinsäure (RNS) und die aus einer Sorte bestehenden Proteinuntereinheiten, zerlegt worden war (Fraenkel-Conrat 1955). Der hierbei ablaufende spontane Prozess, ein self-assembly-Prozess, entspricht dem, der in der Entwicklung des TMV in vivo erfolgt. Sein Zusammenbau beginnt an einem aus Protein und dem 5'-Ende der RNS bestehenden Komplex, an den sich schrittweise die identischen Proteineinheiten anlagern (Okada, Ohno 1972). Derselbe Mechanismus, bei dem die gesamte Information für die korrekte Verbindung zur funktionsfähigen Struktur durch die Bausteine selbst gegeben ist, gilt auch für mehrere andere Viren wie das CCMV (Cowpea Chlorotic Mottle Virus) (Hiebert et al. 1958) und auch für bakterielle Strukturen wie Flagellen (Asakura et al. 1968). So ein self-assembly-Prozess trifft aber bei weitem nicht für die Entwicklung aller Viren zu. So konnten Epstein et al. (1963) zeigen, daß z. B. beim Bakteriophagen T4 viele Genprodukte an einer offenbar viel komplizierteren Morphogenese beteiligt sind (Edgar, Lielausis 1968; Edgar, Wood 1966; King 1968).

Bei den komplexen DNS-Phagen befindet sich ein doppelsträngiges DNS-Molekül in einer Proteinhülle, die aus re-

gelmäßigen Wiederholungen aus meistens einem Hauptkopfprotein besteht. Das Gitter ist an ganz bestimmten Stellen unterbrochen durch Proteine anderer Art, die in geringer Stückzahl vorliegen ("minor proteins"). Sie sind für die endgültige korrekte Form des Kopfes unerlässlich. Am Kopf sitzt noch ein Schwanz oder eine Bodenplatte mit Spikes und Schwanzfäden.

Phagenreifung:

1. Reifung der Phagen mit doppelsträngiger DNS allgemein:

Das Assembly der komplexen Phagen mit doppelsträngiger DNS ist ziemlich intensiv untersucht worden. Zu den bestuntersuchten gehören T2, T4, λ , und P2/P4, die alle auf E.coli parasitieren und P22, der auf Salmonella typhimurium wächst. Von T1, T3, T7, und Mu, ebenfalls E.coli-Phagen, weiß man bisher nur wenig. (als Reviews Murialdo, Becker 1978 (b) ; Casjens, King 1975)

Ermöglicht wurden die bisherigen Kenntnisse durch Isolierung und Charakterisierung konditional letaler Mutanten zunächst von T4 durch Epstein und beil von Campell (Campbell 1961; Epstein et al. 1963; Jara, Murialdo 1975). Hierdurch konnten die meisten am Assembly beteiligten Gene der oben genannten Phagen ihren Funktionen zugeordnet werden und die Molekulargewichte der Proteine mit Hilfe von Polyacrylamid-Gelen bestimmt werden. Einige Proteine konnten auch isoliert werden (P22: Botstein et al. 1972; Botstein et al. 1973; Poteete, King 1977. λ : Becker, Gold 1975; Buchwald et al. 1970; Murialdo, Siminovitch 1971. T4: Black 1974; Dickson et al. 1970; King, Laemmli 1973; King, Mykolajewycz 1973; Showe, Black 1973; Laemmli et al. 1974 (a)).

Die Morphogenese der Phagen mit doppelsträngiger DNS kann ganz allgemein in drei unabhängig voneinander verlaufende Synthesewege gegliedert werden - Reifung des

Kopfvorläufers (prohead), DNS-Replikation und Schwanzreifung-, von denen die beiden ersteren zur endgültigen Kopfreifung zusammenlaufen. Die DNS wird in den prohead verpackt, der dabei die Größe und Form des reifen Kopfes erhält. Nach Stabilisierung des DNS-gefüllten Kopfes treten Kopf und Schwanz zusammen. Die Phagenreifung ist ein genau regulierter Prozess, in dem die verschiedenen Genprodukte ganz bestimmte Funktionen ausüben, die von denen der anderen abhängen. Fällt ein Genprodukt aus, akkumulieren Zwischenprodukte der Reifung, deren Umwandlung von der Aktion des fehlenden Genprodukts abhängig ist.

a) In einem mehrere Schritte umfassenden Prozess wird ein Vorläufer des Kopfes, der Prohead, gebildet, der aus dem Hauptkopf-Protein, einem core (innere Hülle) und den "Minor"-Proteinen besteht. Bei den verschiedenen Phagen ist eine sehr unterschiedliche Zahl von Proteinen an der prohead-Bildung beteiligt, so z. B. bei T4 mindestens 10 Genprodukte, bei λ dagegen nur 4 Phagen-codierte Proteine. Bei diesen beiden Phagen konnte gezeigt werden, daß auch bakteriell codierte Faktoren für die Kopfbildung notwendig sind. (Buchwald et al. 1970; Laemmli et al. 1970 und 1974 (a); Showe, Black 1973. Coppo et al. 1973; Georgopolous et al. 1972, 1973; Sternberg 1973; Takano, Kakefuda 1972)

Bei λ und T4 geht die prohead-Bildung einher mit proteolytischer Spaltung verschiedener Genprodukte. Bei λ konnte auch Proteinfusion nachgewiesen werden. (λ : Kaiser et al. 1974; Hendrix, Casjens 1975; Ray, Murialdo 1975. T4: Hosoda, Cone 1970; Hendrix, Casjens 1974; Kurtz, Champe 1977; Tsugita, Black 1975; Laemmli 1970)

b) Die DNS-Replikation führt zu einem DNS-Molekül, das eine mehrfache Länge des DNS-Moleküls hat, das aus einem reifen Phagen isoliert werden kann (reife DNS). Diese Vor-

läuferstruktur der reifen DNS ist also ein DNS-Konkatemer (P22: Botstein 1968; Botstein, Levine 1968; Tye et al. 1974 (a). λ : Skalka et al. 1972; Wake et al. 1972. T4: Frankel et al. 1971; Streisinger et al. 1964, 1967). Beim Verpackungsprozess wird ein Teil eines Konkatemers in einem energiebedürftigen Prozess in den prohead geschleust. Die Menge der verpackten DNS wird im allgemeinen durch die Kapazität des Kopfes bestimmt-headful-Modus. (P22: King et al. 1973 (b); Rhoades et al. 1968. λ : Kaiser et al. 1975. T4: Laemmli, Favre 1973; Streisinger et al. 1964, 1967) Ist ein Kopf gefüllt, wird die DNS geschnitten. Das entstandene Ende dient als Anfang eines neuen zu verpackenden Moleküls. (P2 nimmt eine Sonderstellung ein.) Dieser DNS-Verpackungsprozess weist für die einzelnen Phagen deutliche Unterschiede auf, was sich an den unterschiedlichen Formen der DNS im reifen Phagen zeigt, die beim Verpackungsprozess entstehen.

P22, T1: Bei beiden ist die DNS terminal redundant und partiell permutiert. Terminal redundant bedeutet, daß sich Sequenzen an den beiden Enden der Moleküle wiederholen und nämlich in gleicher Reihenfolge. Jedes Molekül in einer Phagenpopulation beginnt mit unterschiedlichen Genen bzw. Sequenzen. Dabei umfaßt diese Permutation nur einen ganz bestimmten Bereich des Genoms. Die Enden der Moleküle fallen alle in diesen Bereich. Man nimmt an, daß bei beiden Phagen diese terminale Redundanz und partielle Permutation dadurch entsteht, daß die Verpackung an einer bestimmten Sequenz auf den überlangen DNS-Molekülen, die bei der Replikation oder auf andere Weise gegliedert wurden, beginnt und in einer Richtung (polar) weiterläuft. Wenn der Kopf gefüllt ist, wird die DNS abgeschnitten. Das erste Molekül, das von einem Konkatemer verpackt wird, wird im weiteren Verlauf der Arbeit als "erster headful" bezeichnet. Es wird immer etwas mehr verpackt als einem Genom entspricht. Hierdurch wieder-

holen sich einige Sequenzen am Anfang und am Ende. Der Schnitt, der das Ende des einen Moleküls bildet, dient als Anfang des nächsten. Die Verpackung ist sequentiell.

Dieser Mechanismus der Verpackung ist bei T1 bisher nur mit wenigen Daten belegt (Ritchie, Joicey 1978; Mac Hattie, Gill 1977; Ramsay, Ritchie 1980), bei P22 gibt es bereits mehr Hinweise (siehe S.7-11)

T4: T4-DNS ist ebenfalls terminal redundant und im Unterschied zu P22 und T1 circular (also übers ganze Genom) permutiert. Auch bei diesem Phagen bestimmt vermutlich die Kapazität des Kopfes die Menge der DNS, die verpackt wird. Man weiß bisher wenig über den Verpackungsmechanismus, auch nicht ob die Verpackung an einer bestimmten Sequenz auf dem Konkatemer beginnt oder ob sie an ganz beliebiger Stelle beginnen kann. (Streisinger 1964, 1967)

T7: Die DNS-Moleküle von T7 sind ebenfalls terminal redundant. Alle Moleküle beginnen aber mit den gleichen Sequenzen. Auch bei ihm sind DNS-Konkatemere die Vorläufer für die reife DNS. Diese sind z. T. sehr lang und umfassen bis zu einige Hundert Phagen-DNS-Äquivalente. Über den Mechanismus, wie die reifen Moleküle entstehen - nur Anfangsschnitt oder auch Endschnitt sequenz-spezifisch? sequentielle Verpackung? - ist kaum etwas bekannt. (T7: Dreiseikelmann, Wackernagel 1978; Fröhlich et al. 1975; Strätling et al. 1973; Burck et al. 1979)

λ : Bei λ , dem bezüglich der Verpackung am besten untersuchten Phagen, haben die reifen DNS-Moleküle ebenfalls definierte Enden. Diese werden durch Einzelstränge gebildet und umfassen 12 Nukleotide. Die Sequenzen von Anfang und Ende sind zueinander komplementär. Die Verpackung beginnt an einer bestimmten Sequenz (cos-site) auf dem Konkatemer. Die Länge des verpackten DNS-Moleküls wird außer von der Kapazität des Kopfes zusätzlich vom Vorhandensein einer zweiten cos-site bestimmt. Durch Schnitte an der cos-site, die auf den beiden DNS-Strängen ver-

setzt gesetzt werden, am Anfang und am Ende des Moleküls entstehen die einzelsträngigen Enden der DNS der reifen Phagen. (λ : Sternberg, Weisberg 1977 (a); Skalka et al. 1972; Mousset, Thomas 1969)

P2: Bei P2 entstehen die reifen Moleküle ähnlich wie bei λ . Allerdings sind hier nicht Konkatemere, sondern monomere oder polymere Ringe die Replikationsprodukte. Als Substrat der Verpackung scheinen vorwiegend die monomeren Ringe zu dienen. (Pruss et al. 1974, 1975; Pruss, Calendar 1978; Linquist 1971)

Die Verpackung der DNS geht einher mit einer Vergrößerung des prohead auf die endgültige Phagenkopfgröße, wobei das coreProtein den prohead verläßt. (P22: King et al. 1973; Lenk et al. 1975. T4: Hsiao, Black 1977, Laemmli, Quittenr 1974, λ : Sternberg, Weisberg 1977 (b))

c) Wenn Kopfbildung und DNS-Verpackung erfolgt sind, wird noch der Schwanz bzw. bei P22 die Bodenplatte in einem self-assembly-Schritt an den Kopf geheftet (Israel et al. 1967; Weigle 1966, 1968). Der Schwanz von T4 wird in einer Folge von vielen Schritten zusammengesetzt und ist durch einen komplizierten Aufbau aus verschiedenen Proteinen gekennzeichnet (King, Mykolajewycz 1973; Kikuchi, King 1975), wohingegen die Bodenplatte von P22 aus nur einer Proteinart besteht (Israel et al. 1967; Botstein et al. 1973).

2. Reifung des Phagen P22:

Der temperente Salmonella-Phage P22 besteht aus einer icosaderförmigen Proteinhülle von 600 Å Durchmesser und einem doppelsträngigen DNS-Molekül. An einer der Ecken des Kopfes sitzt ein kleiner Kragen, an dem die Bodenplatte mit einem dünnen Stift in der Mitte haftet. (Botstein et al. 1972; Botstein, Levine 1968)

Das DNS-Molekül hat ein Molekulargewicht von etwa 27×10^6 D. Es ist terminal redundant, das heißt der Anfang des Genoms, bei P22 2%, wiederholt sich am anderen Ende des Moleküls in gleicher Richtung. Jedes Partikel enthält also 2% mehr DNS als ausreichen würde, um einen gesamten Gen-satz zu umfassen (Rhoades et al. 1968; Tye et al. 1974 (a,b)). In einer Population von Molekülen sind diese circular permutiert, d. h. die Moleküle verschiedener Partikel beginnen mit unterschiedlichen Sequenzen bzw. Genen (Rhoades et al. 1968).

Tye et al. (Tye, Botstein 1974) konnten zeigen, daß reife P22 DNS-Moleküle durch eine Variation des headful -Modus, wie er von Streisinger und Mitarbeitern beschrieben wurde (Séchaud et al. 1965; Streisinger et al. 1964, 1967), gebildet werden. Als sie partiell denaturierte P22 DNS-Moleküle im Elektronenmikroskop untersuchten, fanden sie, daß die Enden der Moleküle in einen Bereich von weniger als 20 % der Genkarte fallen. Im headful -Modell von Streisinger ist nicht entschieden, ob die DNS bei der Verpackung in die Phagenköpfe aus einem DNS-Konkatemer herausgeschnitten wird oder ob die Moleküle sequentiell von der Überlangen DNS abgeschnitten werden, wenn die Verpackung einmal an einem Konkatemer begonnen hat. In beiden Fällen wäre die reife DNS einer Phagenpopulation circular permutiert, wenn in den Kopf jeweils etwas mehr DNS als der Genomlänge entsprechen würde, verpackt wurde. Für die Entstehung der begrenzten circularen Permutation (20 % des Phagengenoms), die Tye et al. fanden, kann jedoch nur die zweite Möglichkeit zutreffen, nämlich sequentielles Verpacken (Tye et al. 1974 (b))(Fig. 1).

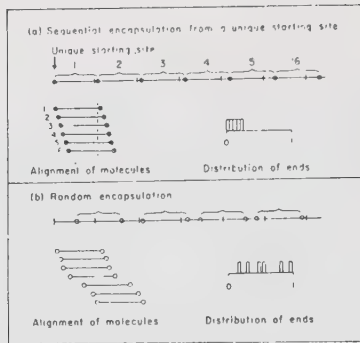


Fig.1: Vergleich sequentieller Verpackung von einem Startpunkt aus und Verpacken zufälliger Anteile des Konkatemers
 a) Die Abbildung zeigt, daß sequentielles Verpacken von einem Punkt aus zu einer begrenzten Verteilung der Enden (begrenzte Permutation) führt, falls das Konkatermer lang genug ist, um eine kleine Anzahl von headfuls zu verpacken.
 b) Zufällige Verpackung führt zu einer beliebigen Verteilung der Enden.
 (aus Tye et.al. 1974, b)

So schlagen sie für P22 folgendes Modell vor: Die Verpackung beginnt an einer bestimmten Sequenz auf dem Konkatermer, die "pac" genannt wird, und läuft sequentiell in einer Richtung weiter. Die Kopfkapazität ist, wie für T4 vorgeschlagen, längenbestimmend für die reifen Moleküle. Alle Schnitte auf dem Konkatermer, außer dem ersten initiiierenden an pac, wären in diesem Fall sequenzunspezifisch. Ist die terminale Redundanz nun 2%, würde die circuläre Permutation etwa 20% umfassen, wenn das Konkatermer etwa die Länge von 10 Phagengenomen aufweist. DNS-Moleküle mit einem 10-fachen Molekulargewicht eines reifen Moleküls waren von Botstein 1968 (und Botstein, Levine 1968) zu Beginn der Phagenentwicklung gefunden worden und als Vorläuferstrukturen der reifen DNS identifiziert worden. Bestätigt werden konnte diese Vorstellung durch ein weiteres Experiment. Tye et al. untersuchten DNS von P22-Deletions- und Insertionsmutanten nach partieller

Denaturierung im Elektronenmikroskop. Sie zeigten, daß die Enden der DNS der Deletionsmutante, die eine terminale Redundanz von 7% hat, in einem Bereich von 60-70% verteilt waren. Auf Grund der vergrößerten terminalen Redundanz wird auch der Bereich für die circulaire Permutation größer. Auch hier wäre ein Konkatermer von 10-facher Genomlänge Voraussetzung.

Jackson et al. (Jackson et al. 1978(b)) stützten dieses Modell durch Untersuchungen von P22 DNS mit der Restriktionsnuklease Eco RI. Restriktionsnukleasen schneiden DNS an spezifischen Sequenzen. Jackson et al. verglichen Eco RI-Spaltprodukte von Wildtyp-DNS mit den Eco RI-Fragmenten von Deletionsmutanten und Insertionsmutanten und zeigten, daß die Verpackung an einer Sequenz (pac) beginnt und von hier sequentiell in einer Richtung verläuft.

Für den Beginn der Verpackung der DNS von einem Konkatermer kann man zweierlei annehmen: entweder die Verpackung beginnt am freien Doppelstrang-Ende des rolling-circle, wäre also in diesem Fall mit dem origin of replicating identisch, oder es gibt eine Basensequenz auf dem Molekül, die bei der DNS-Verpackung als Signal für einen Schnitt durch eine Endonuklease wirkt. Weaver und Levine (1977) zeigten mit genetischen Methoden, daß die Verpackungsinitiationssequenz (pac) nahe Gen 3 liegt. Analysen der DNS mit der Endonuclease Eco RI läßt pac nahe oder im Bereich von Gen 3 vermuten (Jackson et al. 1978 (b)), was mit den anderen Ergebnissen übereinstimmt (Genkarte Fig. 3). Das heißt, daß die pac-Sequenz nicht mit dem origin of replication identisch sein kann, der nahe Gen 12 und 18 liegt (Botstein et al. 1972), und somit die Verpackung auch nicht am freien Ende des rolling-circle beginnt. Es gibt offenbar in der Region von Gen 3 eine Basensequenz, die in noch nicht bekannter Weise die Verpackung der DNA und den ersten Schnitt auf dem Konkatermer initiiert.

Durch Untersuchungen von Botstein et al. (Botstein 1968; Botstein et al. 1972; Botstein, Levine 1968; Botstein et al. 1973), Poteete (Poteete et al. 1979; Poteete, King 1977; Poteete, Botstein 1979), Earnshaw und anderer Autoren (Earnshaw et al. 1976; Earnshaw, King 1978; King et al. 1973; Lenk et al. 1975; Susskind, Botstein 1978, Rev.) sind über die Reifung des Phagen P22 bereits einige Details beschrieben. Genetische Analyse einer großen Zahl von konditional letalen (amber=am) Mutanten, Identifizierung der Proteine, die am assembly beteiligt sind, Charakterisierung der Strukturen, die in Zellen akkumulieren, die mit Morphogenese-Mutanten infiziert wurden und Untersuchungen der Veränderungen der DNS während der Phagenreifung klärten die Reihenfolge und einige Schritte des assembly auf. (Fig.2)

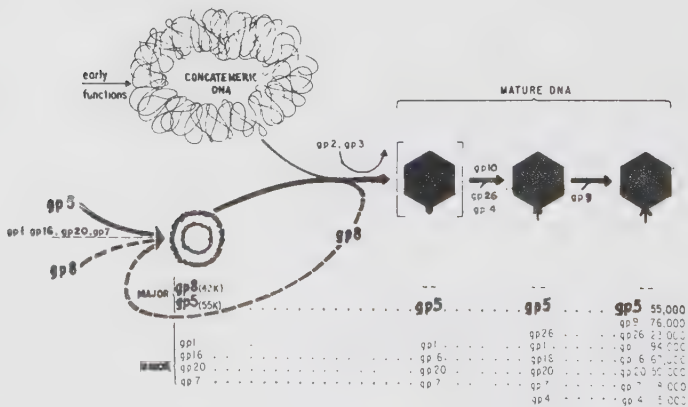


Fig.2: Reifungsprozess des Phagen P22
Unter den Strukturen sind die jeweils enthaltenen Proteine, in der letzten Spalte deren Molekulargewichte angegeben.
(aus Poteete, King 1977)

12 virale Gene (3, 2, 1, 8, 5, 10, 4, 26, 7, 20, 16, 9; die Reihenfolge entspricht der auf der genetischen Karte (Fig.3S.17) bzw deren Produkte sind am Reifungsprozess des Phagen beteiligt.

Die Proteine, für die die 12 Gene codieren, konnten als diskrete Banden auf SDS-Polyacrylamid-Gelen identifiziert und ihre Molekulargewichte bestimmt werden (Fig.3).

Prohead-Bildung:

Die früheste strukturelle Zwischenstufe bei der Kopfbildung ist ein runder prohead, der keine DNS enthält. Er besteht aus zwei Hauptproteinen, den Produkten von Gen 5 und Gen 8, gp 5 und gp 8, und einigen Proteinen, die in geringer Zahl vorliegen, wie gp 1 (8-12 Kopien), gp 7 (20 Kopien), gp 16 (6 Kopien) und gp 20 (15 Kopien). gp 5 (420 Kopien) bildet den Hauptteil, nämlich 85% des reifen Kopfes. Die Proteine sind regelmäßig angeordnet und bilden eine einheitliche Gitterstruktur. Von gp 8, sind etwa 250 Kopien nachweisbar im prohead. Im reifen Kopf fehlt es. Elektronenoptische Bilder und Röntgenstrukturanalysen lassen annehmen, daß die gp 8 Untereinheiten eine Art Gerüst innerhalb der gp 5-Hülle bilden. gp 8 wird deshalb als core-Protein bezeichnet. Durch milde SDS- oder Harnstoffbehandlung von proheads läßt sich gp 8 selektiv entfernen. Übrig bleibt eine intakte Hülle von gp 5. Die Bildung der Hülle und die Bildung des core scheinen von einander abhängige Prozesse zu sein, wobei gp 5 und gp 8 einen Komplex bilden. Beide Genprodukte sind offenbar notwendig, um die richtige Größe und Form des Phagen zu determinieren. Auch bei anderen Phagen benötigt der akkurate Zusammenbau der Hauptkopfproteine zum prohead zusätzliche Morphogenese-Proteine. Diese bilden wie bei P22 im prohead ein core, das im reifen Phagen fehlt (Murialdo, Becker 1978 (b), Rev.; Ray, Murialdo 1975; Showe, Black 1973)

Drei der übrigen Proteine im prohead, nämlich gp 7, gp 16 und gp 20 sind für die Bildung eines normal funktionsfähigen proheads nicht essentiell. Bei Mutanten, die in einem dieser Gene defekt sind, laufen die prohead-Bildung und alle weiteren Assemblyschritte ab und es entstehen wie reife Phagen aussehende Partikel, denen nur das jeweilige Genprodukt fehlt. 7- und 20- sind jedoch unfähig ihre DNS nach Adsorption an eine Wirtszelle zu injizieren. 16 Mutanten können zwar injizieren aber keine Phagenfunktionen exprimieren (Hoffmann, Levine 1975 (a,b); Israel 1977).

gp 1 ist dagegen für die Bildung eines funktionsfähigen proheads unerlässlich. Mutanten in Gen 1 synthetisieren zwar proheads, die im Elektronenmikroskop nicht von gp 1-haltigen zu unterscheiden sind, die weiteren Schritte der Phagenreifung laufen aber nicht ab. Die überlange DNS wird nicht zu Phagengenomlänge geschnitten. Analog zu gp 1 bei P22 gibt es beim Phagen λ Mutanten in Gen B und C und bei T4 in Gen 20, die normal aussehende proheads bilden, die aber keine DNS schneiden und verpacken. (λ : Becker et al. 1977 (b); Murialdo, Ray 1975; Murialdo, Siminovitch 1972 (b); T4: Hsiao, Black 1977; Laemmli 1970) Für alle diese Genprodukte werden ähnliche Funktionen diskutiert, wie Initiation der prohead-Bildung und/oder strukturelle Voraussetzung für die Verpackung von DNS als auch für die Anheftung der Bodenplatte.

DNS-Verpackung:

Die replizierte DNS besteht, wie oben beschrieben, aus mehreren Wiederholungen des P22 Genoms. Von Botstein et al. (1968, 1973) konnten, wie oben erwähnt, lange DNS-Moleküle in Sucrose-Gradienten nachgewiesen werden, die etwa 20 Minuten nach Infektion erscheinen. Diese Strukturen scheinen die direkten Vorläufer der reifen DNS-Moleküle zu sein.

In Gegenwart von gp 2 und gp 3 verpacken vollständige proheads, die also gp 1 enthalten, "headfuls" von DNS (= soviel DNS, wie in den Kopf hineinpaßt). Die DNS wird dabei geschnitten und kondensiert. Gp 2 und gp 3 sind weder im prohead noch im fertigen Phagenkopf nachweisbar. Was für Funktionen sie im einzelnen ausüben, ist nicht bekannt. Poteete postuliert, daß gp 2 und gp 3 einen Komplex bilden, der isoliert werden kann. Eingesetzt in einem in vitro-System, dem gp 2 fehlt, verhilft der isolierte Komplex zur Entwicklung reifer Phagen (Poteete, Botstein 1979). Es gibt Transduktionsmutanten von P22, die in Gen 3 kartieren und erheblich häufiger als der Wildtyp transduzieren. Das läßt auf eine Erkennungsfunktion von gp 3 schließen. Bei diesen Mutanten könnte z. B. die Spezifität der Erkennung nicht mehr so ausgeprägt sein, so daß auf dem bakteriellen Chromosom vermehrt Sequenzen, die der pac-site ähneln, als "pac" erkannt werden. (Raj et al. 1974; Tye 1976; Schmieger 1972) Möglicherweise hat gp 2 eine Nukleasefunktion. Dafür spricht ein sehr hoher Verbrauch von ATP, bzw. die Notwendigkeit von ATP bei den Isolierungsschritten von gp 2 zum Erhalt seiner Aktivität (Poteete, Botstein 1979). Andererseits fand Botstein einen geringeren intrazellulären Abbau von Phagen-DNS in 3⁻-Mutanten, was auf eine Nukleasefunktion von gp 3 hinweisen würde (Botstein et al. 1972). Vorstellbar sind auch Funktionen von gp 2 und gp 3, bevor sie in einem Komplex aktiv werden. Versuche von Jarvik und Botstein (1973) lassen vermuten, daß gp 2 erst nach gp 1 und gp 3 benötigt wird (die Versuche beruhten auf hitze- und kältesensitiven Mutanten, die Temperatur-Shift-Experimenten unterzogen wurden).

Beim Prozess der DNS-Verpackung verliert der prohead das gp 8. Im Unterschied zu den core-Proteinen von (Ray, Murialdo 1975) und T4 (Showe, Black 1973) wird gp 8 dabei nicht gespalten. Die freigesetzten Moleküle

von gp 8 können wieder einen Komplex mit gp 5 eingehen und neue proheads bilden (King, Casjens 1974).

Die Verpackung der DNS ist begleitet von der Vergrößerung der Hülle.

Die Funktion von mindestens drei Proteinen, gp 1, gp 2, und gp 3 und das Herauswandern von gp 8 sind also für erfolgreiche DNS-Verpackung notwendig. Es ist unbekannt, ob das Verpacken der DNS, das Freisetzen von gp 8 und die Expansion der Hülle gleichzeitig erfolgen oder aber in bestimmter Reihenfolge ablaufen.

Fertigstellung des Phagenkopfes:

Die dritte Phase der Phagenreifung besteht aus einer Stabilisierung der DNS-gefüllten Köpfe durch drei Proteine: gp 4, gp 10, und gp 26. Sie bilden vermutlich außerdem die Kopf-Schwanzverbindung. Gp 4 und gp 26 sind im reifen Kopf nachweisbar, für gp 10 konnte das nicht festgestellt werden, da gp 10 und gp 5 durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht trennbar sind. Mutanten in einem dieser drei Gene verpacken die DNS zwar, die Köpfe verlieren sie aber vielfach wieder, wobei leere Köpfe entstehen, die sich von proheads deutlich unterscheiden.

Kopf-Schwanz-Assembly:

Der letzte Schritt der Morphogenese zum infektiösen Partikel ist die Anheftung der Bodenplatte, die aus 18 Kopien von gp 9 besteht, die vermutlich jeweils zu Trimeren verbunden sind. Die Verbindung erfolgt in einem self-assembly-Schritt. An dem korrekten Zusammenbau sind weder Enzyme noch energieliefernde Stoffe wie ATP notwendig (Israel et al. 1967). Im Unterschied

zu λ (Katsura, Kühl 1975) und T4 (Kikuchi, King 1975; King 1968; King, Mykolajewycz 1973) scheint bei P22 das Schwanzassembly ein recht einfacher Prozess zu sein.

Auch wenn vieles über den Ablauf der Reifung von P22 über die beteiligten Proteine und über die Veränderungen der DNS bekannt ist, so bleiben noch viele Fragen ungeklärt. Wie wirken gp 5 und gp 8 zusammen? Welche Funktionen üben gp 2 und gp 3 vor/bei der DNS-Verpackung aus? Sind sie nur an der Verpackung beteiligt oder haben sie noch weitere, bisher nicht erkannte Aufgaben? Welche Vorstellungen über die Wirkungsweise von gp 1 können bestätigt werden? Wie sieht die Sequenz von pac aus? Gibt es pac-Sequenzen auf dem bakteriellen Chromosom? etc. Um zumindest einige dieser Fragen zu klären, ist es vielversprechend, die einzelnen Schritte der Reifung im zellfreien System, bzw. in vitro zu untersuchen. Durch Verwendung geeigneter Mutanten, durch Zufügen und Weglassen einzelner Komponenten gibt es eine ganze Reihe von Möglichkeiten, die Probleme anzugehen. Solche in vitro-Versuche sind bei λ schon seit einigen Jahren möglich und es konnten eine Menge Kenntnisse auf diese Weise gewonnen werden (Kaiser et al. 1975; Kaiser, Masuda 1973; Hohn 1975). Auch für P2/P4, T3, T7 sind kürzlich solche in vitro Systeme entwickelt worden (P2: Pruss et al. 1974, 1975. T3: Fujisawa et al. 1978; Yamagishi et al. 1980. T7: Kerr, Sadowski 1974; Masker, Kümmerle 1978). Über Untersuchungen von Vorstufen hinaus, ist es auch möglich, die Verpackung der DNS in vitro zu untersuchen. Solche Untersuchungen waren aber bisher bei keinem der terminal redundanten und circular permutierten Phagen wie T1, T4 und P22 beschrieben worden. Studien der Morphogenese von P22 in vitro begannen mit der Demonstration, daß Schwänze aus gp 9, zu Köpfen zugefügt, in einer effizienten self-assembly-Reaktion

zu infektiösen Partikeln führen (Israel 1967). Botstein et al. (1973) zeigten später, daß Lysate von am10 bzw. am26-infizierten Zellen in vitro komplementiert werden können, wenn sie mit Lysaten gemischt werden, die aus Zellen bestanden, die mit einer anderen Reifungsmutante z. B. am5, infiziert waren. Der instabile mit DNS gefüllte Kopf konnte durch nachträgliche Funktion von gp10 bzw. gp26 vervollständigt werden. Ähnliche in vitro-Versuche mit Mutanten in Gen 16 und 20 führten nicht zu infektiösen Phagen, was darauf hinweist, daß diese Produkte sehr früh in den Kopf eingebaut werden müssen, obwohl sie erst nach der gesamten Fertigstellung des Phagen bei Infektion der DNS aktiv werden. Nachträglich sind diese Funktionen nicht komplementierbar.

In dieser Arbeit sollte ein Versuchssystem entwickelt werden, mit dem es möglich sein sollte, die Schritte der DNS-Verpackung beim Phagen P22 in vitro zu untersuchen. Hierzu war es notwendig, einen Versuchsansatz zu erstellen, der folgenden Kriterien genüge:

- Verpackung von DNS in vitro muß eindeutig nachweisbar sein
- Die Ergebnisse müssen reproduzierbar sein
- Einzelne Faktoren, die das Ergebnis und die Effektivität des in vitro-Prozesses beeinflussen, müssen optimiert sein.

Außerdem sollten einige Fragen, die die DNS-Verpackung betreffen, wie z. B. die Beteiligung der Genprodukte 1, 2 und 3, mit Hilfe des entwickelten Systems angegangen werden.

Als die Entwicklung eines optimierten Versuchsansatzes mit dem reproduzierbar DNS verpackt und das eindeutig nachgewiesen werden kann, abgeschlossen war, erschienen Arbeiten von Poteete und Botstein (1979), die eine ähnliche Methode beschrieben, mit der in vitro Ver-

Packung von P22-DNS möglich ist. Poteete verwendete als DNS-Donor Extrakte aus Zellen, die mit einer am5-Mutante infiziert waren, also Überlange Phagen-DNS enthielten. Bei Zugabe von gereinigten proheads und ATP als Energiequelle konnte er in vitro entstandene infektiöse Partikel nachweisen.

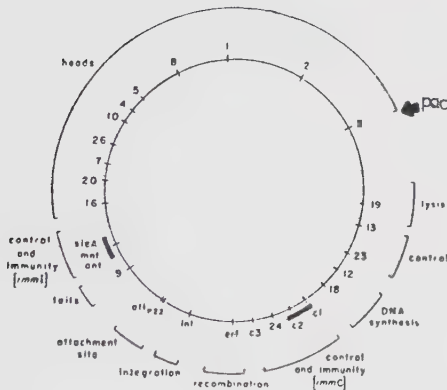


Fig.3: Genkarte von P22 und Funktionen der Genprodukte (verändert nach Susskind, Botstein 1978)

B. Material und Methoden

B.1. Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
LT2	prototropher Wildtyp	Labor
Su70	cys _{am} su ⁺	Labor
Su70(sie)	wie Su70, sie1-lysogen	Eigenisolat
Su70(L)	wie Su70, L-lysogen	Eigenisolat
T4/2	NG-induzierte Mutante von LT2, auxotroph für Thymin/ Thymidin	Labor
end ⁻ =DB5575	cysA1348 hisC527 end-1 str	Susskind/Bot- stein
DB 122		Botstein
DB 147		"
DB 5008		"
DB 5056		"
DB 5058		"
DB 5062		"
DB 5064		"

B.2. Bakteriophagen

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
P22-Mutanten:		
H5	c ₂	Labor
sie1	sieA sieB ts12.1 ts2.1	Levine
am1	1 ⁻ am N10 c ₁	Botstein
am2	2 ⁻ am H200 c ₁	"
am3	3 ⁻ am N6 c ₁	"
am5	5 ⁻ am N114 c ₁	"
am69	5 ⁻ am H69	Labor
am8	8 ⁻ am H202 c ₁ h ₂₁	Botstein

am9	9-am N9 m ₃ sieA sieB	Botstein
am10	10-am N107 c ₁	"
am13	13-am H101 c ₂	Labor
am16	16-am H59	Kolstad
am20	20-am H64	Kolstad
am26	26-am H204 c ₁	Botstein
am1 am13	hervorgegangen aus Kreuzung der am-Mutanten 1 und 13	Eigenisolat
am2 am13	am2 X am13	"
am5 am69 am13	am5 X am69 X am13	"
am8 am13	am8 X am13	"

Phagen und P22-L-Rekombinanten:

L	Phage L, c ₁	Stocker
am2 am13 c ^L _I P22	2-am H200 13-am H101 J ^{P22} c ^L	Eigenisolat
am2 c ^L _I P22	2-am H200 J ^{P22} c ^L	"
am3 c ^L _I L	3-am N6 J ^L c ^L	"

B.3. Medien

a. NB-Medium

Bacto-Nutrient Broth	8g
NaCl	5g
H ₂ O, entionisiert	1l

b. NB-Agar

NB-Medium + 1,5% Bacto-Agar

c. NB-Weichagar

NB-Medium + 0,7% Bacto-Agar

d. Hershey-Broth (HB)

Bacto-Nutrient Broth	15g
Bacto-Pepton	5g
NaCl	5g

Nach dem Autoklavieren wird Glukose (Endkonz. 0,1%) zugegeben.

e. M9-Medium

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	15g
KH_2PO_4	3g
NaCl	1g
NH_4Cl	1g
H_2O , entionisiert	1l
Nach dem Autoklavieren werden zugesetzt:	
MgSO_4 , 0,1M	10ml
Glukose 20%	10ml

B.4. Puffer und Lösungen

a. Verdünnungsflüssigkeit (VF)

Bacto-Trypton	1g
NaCl	10g
H_2O , entionisiert	1l

b. Tris-Puffer, pH 7,4

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 1M oder 0,1M, wird in entionisiertem Wasser gelöst und der pH mit HCl auf 7,4 eingestellt.

c. Tris/EDTA-Puffer

Tris-HCl Puffer, pH 7,4	0,01M
EDTA	1mM

d. Neutrale Sucrose-Lösung (Botstein 1968)

5g oder 20g Sucrose	
Tris-HCl, 1M, pH 8,0	2ml
EDTA, pH 8,5, pH 8,5	2ml
SDS, 20%	0,33ml

wird aufgefüllt auf 100ml mit entionisiertem H_2O .

e. Szintillationsflüssigkeit

PPO	5g
Dimethyl-POPPO	0,3g
Toluol	1l

f. Lysis-Puffer nach Worcel (1972)

Lsg A:

Tris-HCl, pH 8,2

10mM

NaN₃

10mM

Sucrose

20% w/v

NaCl

100mM

mit entionisiertem H₂O auf 10ml auffüllen

Lsg B:

Tris-HCl, pH 8,2

120mM

EDTA

50mM

Lysozym

4mg

mit entionisiertem H₂O auf 10ml auffüllen

Lsg C:

Brij 58

1%

Na-Deoxycholat

0,4%

NaCl

2M

EDTA

10mM

g. Reaktionspuffer für Verpackungsansätze
nach Kaiser und Masuda (1973)

Tris-HCl

6mM

ATP

1,5mM

Mercaptoäthanol

3mM

Spermidin-HCl

6mM

MgCl₂

1,8mM

h. Reaktionspuffer für Verpackungsansätze
modifiziert, für Standardansätze

Tris-HCl

25mM

ATP

1,5mM

Mercaptoäthanol

3mM

Spermidin-HCl

6mM

MgCl₂

40mM

i. Inkubationspuffer für Eco RI

Tris-HCl, pH 7,2	100mM
NaCl	50mM
MgCl ₂	10mM

j. Inkubationspuffer für Hind III

Tris-HCl, pH 7,6	10mM
MgCl ₂	10mM
Dithiothreitol	14mM
NaCl	50mM

k. Inkubationspuffer für Sal I

Tris-HCl, pH 7,9	6mM
NaCl	150mM
MgCl ₂	6mM
Dithioerythrol	6mM

l. Elektrophoresepuffer

Tris-Acetat, pH 8,3	40mM
Na-acetat	20mM
EDTA	2mM
Äthidumbromid	0,4ug/ml

m. Nick-Translations-Puffer, 10 x konz.

Tris-HCl	4M
MgCl, pH 8	0,06M
-Mercaptoäthanol (70ul/10ml)	0,1M

n. Säulenpuffer

Tris-HCl, pH 8	10mM
NaCl	10mM
EDTA, pH 7,7 entgast	2mM

o. Fällpuffer

Tris-HCl	1M
Na-Phosphat	1%
Na-Pyrophosphat	1%

B.5. Chemikalien und Enzyme

Desoxyadenosin, Fluka, Heidelberg

2-desoxy-Thymidin, p.A., Serva Heidelberg

Thymidin-6-³H, 5 Ci/mMol, Amersham Buchler Braunschweig

Thymidin-2-¹⁴C, 50 mCi/mMol, Amersham Buchler Braunschweig

α -AT³²P 2000-3000 Ci/mMol, Amersham Buchler Braunschweig

PPO, dimethyl-POPPOP, Packard

Cellulosenitratfilter, Selectron Typ BA85, 25mm, PG 0,45 μ m,
Schleicher und Schüll

Toluol, Baker Deventer

Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris), 99,8%, Serva
Heidelberg

Äthylendinitrotetraacetat, Dinatriumsalz (EDTA), p.A.,
Merck Darmstadt

Phenol, Merck Darmstadt

Na-dodecylsulfat (SDS), Merck Darmstadt

Cellex-E-Cellulose, Bio-Rad Laboratories

Cäsiumchlorid, 99,5%, Merck Darmstadt

Lysozym, 3 x krist. reinst, Serva Heidelberg

Seakem-Agarose, Marine Colloids USA

Äthidiumbromid, reinst, Serva Heidelberg

Eco RI, Boehringer Mannheim

HindIII, Boehringer Mannheim

Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim

Spermidin, reinst, Serva Heidelberg

Putrescin, Sigma St. Louis/USA

DNase I, 450 Einheiten/mg Serva Heidelberg

DNA-Polymerase I, Reinheitsgrad I, Boehringer Mannheim

2-Mercaptoäthanol, Serva Heidelberg

Bovin Serum Albumin (BSA)

Cammassie Brilliant Blue

Dithiothreitol

Dialysesschläuche, Union Carbide Corporation

flüssiger Stickstoff, aus einer Aufbereitungsanlage
von Philips

gasförmiger Stickstoff, nachgereinigt, aus Flaschen mit
200 atm Anfangsdruck von Linde

B.6. Methoden

6.1. Übernachtkulturen (ÜK)

NB-Medium wird in einer 1/100 Verdünnung mit der jeweiligen Stammkultur (stationäre Phase) angeimpft und im Rollbebrüter bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Kultur hat dann einen Titer von 2×10^9 Zellen/ml.

6.2. log-Kulturen

Aus einer ÜK wird NB-Medium oder HB-Medium in einer 1/1000 Verdünnung beimpft und bei 37°C so lange belüftet, bis eine Dichte von 2×10^8 Zellen/ml erreicht ist.

6.3. Lysogenisieren der Bakterienstämme

Um Bakterienstämme zu erhalten, die einen Prophagen tragen, tropft man auf eine mit dem zu lysogenisierenden Stamm vorplattierte Platte einen Tropfen des entsprechenden Phagen. Nach Inkubation bei 37°C zeigt sich im Bakterienrasen ein Lysisareal, das lysogenisierte Bakterien enthält. Man streicht Proben dieses Areals auf NB-Platten zu Einzelkolonien aus. Nach wiederholtem Abimpfen und Ausstreichen der Einzelkolonien zum Zwecke der Reinigung werden diese auf Lysogenie getestet.

6.4. Lysogenietest

Zunächst prüft man, ob die Zellen gegen den Phagen immun sind, mit dem lysogenisiert wurde. Dazu wird der Phage auf eine mit dem zu testenden Stamm vorplattierte NB-Platte getropft. Bei Immunität zeigt sich keine Lyse.

Außerdem testet man, ob die Zellen Phagen freisetzen, wie das bei einer wachsenden lysogenen Bakterienkultur immer der Fall ist. Die in den lytischen Zyklus übergegangenen Phagen lassen sich durch Auftropfen des zu

testenden lysogenen Stammes auf eine mit LT2 vorplattierte Platte durch entstehendes Lysisareal bei Inkubation nachweisen.

6.5. Bestimmen von Phagentitern

Ein Tropfen einer frischen ÜK des entsprechenden Indikators werden in 2ml flüssigem Weichagar mit 0,1ml einer geeigneten Verdünnung des Phagenlysats in VF gemischt und gleichmäßig über eine NB-Platte verteilt. Nach Bebrüten bei 37°C kann man die plaques, die jeweils von einem Phagen herkommen, auszählen.

Indikator für H5:	LT2
" am-Mutanten:	Su70J
" P22-L Hybride:	Su70(sie)

6.6. Phagenvermehrung

Eine log-Kultur wird mit einer Infektionsmultiplizität von 5 Phagen pro Zelle ($\text{moi}5$) infiziert. Die infizierte Kultur wird bei 37°C belüftet, bis sie durch Lyse aufklart. Zur vollständigen Lyse und Abtötung restlicher Zellen wird CHCl_3 zugegeben und noch 10 Minuten weiterbelüftet. Die Zellreste werden abzentrifugiert (5800g, 20°C). Im Überstand befinden sich die Phagen.

6.7. Konzentrieren von Phagen über eine Ecteola-Säule

Eine Säule mit Cellex E (Ecteola) wird mit 1M NaOH equilibriert und mit sterilem H_2O neutralisiert. Das Phagenlysats wird auf die Säule gegeben. Anschließend werden die an der Zellulose haftenden Phagen mit 0,3M NaCl eluiert. In Peakfraktionen erhält man Titer von etwa 20^{12} Phagen/ml.

6.8. Reinigen und Konzentrieren von Phagen über einen CsCl-Gradienten

In 30 ml-Cellulosenitratröhrchen werden 5ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von $1,6\text{g/cm}^3$ mit 10ml einer Lösung mit einer Dichte von $1,4\text{g/cm}^3$ überschichtet. Die Dichte der Lösungen wurde im Refraktometer eingestellt. Auf diesen Stufengradienten wird das Phagenlysate aufgebracht. Zentrifugiert wird 90 Minuten bei $23^\circ\text{C}/23000\text{g}$ im SW27.1-Rotor in der präparativen Ultrazentrifuge L-2 (Beckman). Die Phagen (Dichte $1,5\text{g/cm}^3$) sind nach dem Lauf in einer Bande zwischen den beiden CsCl-Lösungen konzentriert. Sie werden mit einer Kanüle von der Seite oder von unten abgezapft und 90 Minuten lang gegen Tris-HCl Puffer, pH 7,4, $1/100\text{M}$ dialysiert, um das CsCl zu entfernen.

6.9. Isolierung von Phagen-DNS

Geschmolzenes Phenol wird mit $0,1\text{M}$ Tris-Puffer, pH 7,4 gesättigt. Die obere Phase (Puffer) wird verworfen. Ein gereinigtes Phagenlysate wird mit dem gleichen Volumen puffergesättigten Phenols gemischt und vorsichtig 10 Minuten lang gerollt. Zur anschließenden Phasentrennung wird 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (5800g). Die obere wäßrige Phase enthält die DNS. Der Vorgang wird noch ein- bis zweimal wiederholt, um den notwendigen Reinheitsgrad für Verpackungsexperimente und Restriktionsanalyse zu erreichen. Die DNS-Phase wird anschließend bei 4°C gegen Tris/EDTA Puffer dialysiert. Dabei wird der Puffer mehrmals in mindestens 6-stündigem Abstand gewechselt. Die Dialyseschläuche müssen vor Gebrauch je 15 Min. in $0,1\text{M}$ NaHCO_3 , $0,01\text{M}$ EDTA und zweimal in entionisiertem Wasser gekocht werden.

Die Reinheit der DNS wird in einem Spektralphotometer (Beckman) über den Quotienten $E(260)/E(280)$ ermittelt.

Der Wert soll zwischen 1,6 und 2,0 liegen (Thomas, Abelson 1966). Die Konzentration der DNS wird durch die Extinktion bei 260nm bestimmt; 1µg DNS/ml entspricht einem Wert von 0,02 (Lichtweg 10mm). Vor Spaltung mit Restriktionsnukleasen wird die DNS, wenn nötig, nochmals durch Alkoholfällung gereinigt und konzentriert.

6.10. Äthanol-fällung der DNS

Die gekühlte DNS wird mit 2,5fachen Volumen gekühltem absolutem Äthanol und 1/10 Vol. 3M Na-acetat versetzt. Über Nacht in -20°C oder in 30 Min. bei -80°C fällt die DNS aus. Sie wird in der Sorvallzentrifuge im SS34-Rotor, 10 Min., 10000rpm, abzentrifugiert, das Pellet im Exsikkator getrocknet. Anschließend wird die DNS in Tris/EDTA-Puffer gelöst.

6.11. Spaltung der DNS mit Restriktionsnukleasen

1-10µg Phagen-DNS in 10µl Puffer werden in 40µl des entsprechenden Inkubationspuffers aufgenommen, 5-20 Einheiten Restriktionsenzym (1µl) zugefügt und 1 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Proben mit etwa 10µl 0,1% Bromphenolblau in Ficoll versetzt.

6.12. Agarose-Gelelektrophorese

0,8% bzw. 2%ige Agaroselösung in Wasser wird 10 Min. gekocht, nach Abkühlen unter 60°C wird 1/50 Volumen 50 x Puffer und Äthidiumbromid (Endkonz. 1µg/ml) zugegeben. Zunächst wird in einer Gelkammer mit der 2%igen Lösung ein Stützgel gegossen. Nach Erstarren dieses Blocks wird das eigentliche Gel mit der 0,8%igen Agarose hergestellt. Für den Lauf wird Elektrophoresepuffer in Kammern, die in Verbindung zum Gel stehen, eingefüllt. Die Proben werden aufgetragen. Elektrophorese bei 120V für 4 Stunden ist

zur Trennung der Fragmente geeignet. Unter UV-Licht werden die DNS-Banden im Gel sichtbar. (260nm) Zur Dokumentation werden die Gele photographiert. (Agfa Gevaert 9x12, Entwickler:Eukobrom; Fixierer: Superfix)

6.13. DNS-Isolierung aus infizierten Zellen

Eine log-Kultur von LT2 oder end⁻-Zellen wird mit dem Lysat einer am1, 2 oder 3-Mutante infiziert (moi5). Nach 45 bis 60 Minuten Belüften bei 37°C wird die infizierte Kultur eisgekühlt und abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, GS-3-Rotor, 6000 rpm, 4°C). Das Pellet wird in 1/50 Volumen Tris-HCl Puffer (10mM, pH 7,4 mit EDTA 1mM) aufgenommen. Die DNS wird durch sehr vorsichtiges Rollen mit gleichem Volumen puffergesättigtem Phenol (siehe 6.9.) extrahiert. Aufbewahrt wird die DNS-Probe in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C. Vor Gebrauch wird sie in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, anschließend in Eis gestellt.

6.14. ³H-Markierung von Phagen-DNS

Um Phagen-DNS zu markieren, wird der thymidin-bedürftige Stamm T4/2 als Wirt benutzt. M9-Medium, das mit 20µg Thymidin supplementiert wurde, beimpft man in einer 1/100 Verdünnung mit T4/2 und läßt zur ÜK wachsen. Der an das Medium adaptierte Stamm wird nun in einer 1/1000 Verdünnung im gleichen Medium angeimpft und bei 37°C belüftet bis eine Dichte von etwa 2×10^8 Zellen/ml erreicht ist. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 58X0g wird das Pellet in M9-Medium mit 3µg Thymidin/ml und 10µCi ³H-Thymidin/ml und 250µg/ml Desoxyadenosin aufgenommen (³H-Thymidin: spezifische Aktivität 5000µCi/mMol, entspricht 0,48µg Thymidin/10µCi ³H-Thymidin) und mit H5-Phagen (moi5) infiziert.

Nach Lyse der Zellen, bzw. nach 90 Min. Belüftung bei 37°C werden einige Tropfen CHCl_3 zugefügt und nach weiteren 10 Minuten Belüftung die Zellreste abzentrifugiert (5800g). Die markierten Phagen werden über einen CsCl -Gradienten (6.8.) gereinigt. Anschließend wird die DNS extrahiert. Dazu werden die Phagen mit SDS (2% Endkonzentration) versetzt und 20 Minuten lang in 65°C inkubiert. Die freigesetzte DNS wird über einen neutralen linearen Sucrosegradienten gewonnen (6.18.).

6.15. Markierung der Phagen-DNS in infizierten nicht permissiven Zellen mit ^{14}C -Thymidin

Bis zur Infektion mit den Phagen wird genauso vorgegangen wie bei der Markierung mit ^3H -Thymidin (6.14.). Das Markierungsmedium enthält statt ^3H -Thymidin 0,5 μCi ^{14}C -Thymidin (spezifische Aktivität 50mCi/mMol, entspricht 4,8 μg Thymidin/1 μCi ^{14}C -Thymidin). Nach Infektion mit einer am-Mutante und Belüftung bei 37°C für 40 Minuten werden die infizierten Zellen abzentrifugiert (10 Min., 20°C, 5800g), das Pellet in 1/10 Volumen Tris/EDTA-Puffer aufgenommen. Nach Inkubation mit SDS (Endkonzentration 2%) bei 65°C für 20 Minuten, werden die aufgeschlossenen Zellen mit gleichem Volumen puffergesättigten Phenol gerollt (6.9.). Nach Phasentrennung wird eine Probe der wässrigen Phase auf einen neutralen linearen Sucrosegradienten aufgetragen, um das Molekulargewicht der DNS zu bestimmen.

6.16. Markierung bakterieller DNS mit ^{14}C

M9-Medium mit 20 μg Thymidin/ml wird mit T4/2 infiziert, die Kultur bis zu einem Titer von 2×10^8 /ml bei 37°C inkubiert, anschließend zu einer 1/100 Konzentration in M9-Medium verdünnt und ^{14}C -Thymidin (0,5 μCi ^{14}C /ml)

zugegeben. Nach 80 Minuten Inkubation bei 37°C werden die Zellen in der Minifuge abzentrifugiert. Das Pellet wird in einem 1/10 des Ausgangsvolumens M9-Medium aufgenommen.

6.17. Isolierung bakterieller DNS

Eine konzentrierte logarithmische oder stationäre Zellkultur wird mit dem gleichen Volumen Tris-gesättigten Phenol (siehe 6.9.) vorsichtig gerollt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (6.9.) wird die wässrige Phase, die die DNS enthält, entweder direkt auf einen linearen Sucrosegradienten gegeben oder für andere Zwecke wie einer Spaltung mit Restriktionsnukleasen dreimal 5 Stunden gegen Tris-EDTA-Puffer dialysiert.

6.18. Neutraler linearer Sucrose-Gradient (5-20%)

In einem 5ml Cellulose-Nitratröhrchen wird ein Sucrosegradient gemischt, dessen unterste Schicht (0,15ml) aus einem CsCl-Kissen (1,2g/ml) besteht.

Anschließend werden 2,2ml von der 5%igen und 2,1ml der 20%igen Sucroslösung zu einem 5 bis 20%igen Gradienten gemischt. Darauf werden 0,1ml der DNS-Probe aus infizierten Zellen nach ¹⁴C-Markierung und als Referenz 0,05ml der ³H-markierten H5-DNS aufgeschichtet. Der Gradient wird in der Ultrazentrifuge im Rotor SW 39 bei 23000rpm, 23°C, für 3 Stunden zentrifugiert. Anschließend wird der Boden des Röhrchens mit einer Kanüle durchbohrt und jeweils 10 Tropfen auf einem Glasfaserfilter aufgefangen. Man erhält etwa 60 Fraktionen.

6.19. Fällung der Fraktionen und Zählen im Szintillationszähler

Zunächst werden die Filter ca. 1 Stunde bei 60°C getrocknet, dann zur Fällung der DNS für eine Stunde in 10%ige TCA (Trichloressigsäure) gelegt. Nach einem Acetonbad von 30 Minuten Dauer, um die TCA auszuwaschen,

und abermaligem Trocknen bei 60°C werden die Filter in je 5ml Toluol-Szintillatorflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität der filtergebundenen DNS wird im Szintillationszähler Mark II der Firma Nuclear Chicago bestimmt.

6.20. Bestimmung der Molekulargewichte der zentrifugierten markierten DNS

Nach Auswertung der Gradienten im Szintillationszähler wird die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten zeichnerisch dargestellt. Dabei trägt man die Impulse/min an der Ordinate auf, die Fraktionsnummern bilden die Abszisse. Die Sedimentationsstrecke der ³H-markierten Referenz-DNS (H5), gemessen vom Meniskus des Gradienten bis zum Maximum der Radioaktivität wird verglichen mit derjenigen der ¹⁴C-markierten DNS aus Infektionen von LT2-Zellen oder aus nicht infizierten LT2-Zellen. Mit folgender Beziehung läßt sich das Molekulargewicht der unbekannten DNS ermitteln:

$$\frac{D_2}{D_1} = \left(\frac{M_2}{M_1} \right)^{0,35}$$

Dabei sind M_1 und M_2 die jeweiligen Molekulargewichte und D_1 und D_2 die entsprechende Sedimentationsstrecke, ausgedrückt in Fraktionen (Burgi, Hershey 1963).

6.21. Kreuzung von verschiedenen P22-am-Mutanten mit dem Phagen L

Eine log-Kultur von Su70 wird mit den zu kreuzenden Phagen jeweils in einer $moi=10$ infiziert und belüftet bis Lyse eintritt. Nach $CHCl_3$ -Zugabe wird durch Pelletieren der Zellreste (2.6.6.) das Phagenmischlysat gewonnen. Die Phagen werden in geeigneter Verdünnung auf den Indikatorstamm Su70 plattiert, so daß Einzel-

plaques erhalten werden. Diese impft man mit Zahnstocher ab und überträgt sie durch Einstechen in den Agar auf vier Platten, die mit folgenden Stämmen vorplattiert sind: Su70, LT2, Su70 (sie1) und Su70 (L) um die Einstichstelle Lyse zeigen, sind die gesuchten Rekombinanten. Sie werden aus der mit Su70 vorplattierten Platte mit einer Pasteurpipette ausgestochen, das Agarblöckchen in 1ml NB suspendiert und die restlichen Bakterien mit einem Tropfen CHCl_3 abgetötet. Die isolierten P22-L-Hybride werden durch mehrmaliges Ausplattieren und Ausstechen von Einzelplaques gereinigt und auf den oben genannten Indikatoren getestet.

Außerdem wird je nach am-Mutation noch geprüft, ob sie auf Stämmen wachsen, die einen deletierten Prophagen tragen (DB-Stämme). Die Deletionen sind in ihrem Ausmaß bekannt. Eine am2-Mutante kann auf dem Stamm DB 5064 nicht wachsen, da der Prophage ein Deletion, die von Gen 9 bis einschließlich Gen 2 reicht, trägt (Chan, Botstein 1972). Auf DB 5008 kann er dagegen wachsen, da die Deletion des Prophagen nur bis zum Gen 5 geht. am3 wächst nicht auf DB 5056, aber noch auf DB 5064. am13 wird mit den Stämmen DB 147 und DB 122, auf dem die Mutante wachsen kann, geprüft.

Die am-Mutation wird außerdem noch durch Komplementationstest geprüft. Das geschieht durch Auftropfen des gekreuzten Hybrids auf eine mit LT2 vorplattierte Platte getestet. Hierbei muß die Verdünnung so gewählt werden, daß im Tropfen keine Rückmutanten enthalten sind. Auf solche Tropfen wird jeweils ein Tropfen bekannter am-Mutanten gegeben. Wird eine am1-Mutante auf einen Tropfen mit am2-L-Hybrid getropft, bildet sich nach Inkubation bei 37°C ein Lysisareal, da sich die beiden verschiedenen Mutanten komplementieren können. Tropft man aber am2 auf, ist das nicht möglich, es entsteht kein Lysisareal.

6.22. Kreuzung von verschiedenen P22-am-Mutanten

Es wird genauso vorgegangen, wie bei der Kreuzung von am-Mutanten mit dem Phagen L, die Prüfungen erfolgen aber nur auf Su 70 und LT2 und den geeigneten DB-Stämmen.

6.23. Präparation von Zellextrakten (Standardmethode, Abweichungen werden im Text angegeben)

HB-Medium wird in einer 1/1000 Verdünnung mit dem Stamm end⁻ (=DB 5575) beimpft und die Kultur bis zu einer Zelldichte von $3-4 \times 10^8$ Zellen/ml belüftet. Nach Infektion mit der gewünschten am-Mutante ($moi=3$) wird 60 Minuten weiterbelüftet, die infizierte Kultur anschließend durch Umgießen in ein eisgekühltes Gefäß schnell abgekühlt. Die Zellen werden in der Sorvall-Zentrifuge im GS 3-Rotor mit 6000rpm bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 1/200 Volumen Reaktionspuffer ohne ATP aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren, in dem die Extrakte auch aufbewahrt werden. Das ist auch in einer -80°C Kühltruhe möglich. Direkt vor Verwendung in einem Verpackungsansatz werden die Zellen lysiert, indem sie dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut werden.

6.24. Aufschluß von infizierten Zellen nach Worcel (1972)

40ml einer stationären Bakterienkultur oder einer infizierten log-Kultur werden abzentrifugiert (5800g) und in ein 1/10 Volumen eisgekühlte Lösung A (nach Worcel) aufgenommen und 8ml der Lösung B zugefügt. Nach 90 Sekunden in Eis wird mit 50ml von Lösung C ergänzt. Das Ganze wird 10 Minuten lang bei 25°C vorsichtig geschüttelt.

6.25. Ansatz zur Verpackung von DNS in vitro (Standardansatz, Abweichungen sind im Text angegeben)

Zwei mit verschiedenen am-Mutanten infizierte Extrakte werden nach dem Auftauen mehrmals in einer Spritze gezogen (Kanülenstärke Nr.1), um die DNS zu zerstören und so zu verhindern, daß sie mit der zugebenen DNS konkurriert. Die Extrakte werden dann 2 Minuten bei 25000g (Tischzentrifuge) zentrifugiert und gleiche Volumina - im allgemeinen 25 oder 50 μ l - der Überstände gemischt. Nach Zugabe von 1 bis 2 μ l DNS, was 1 bis 15 μ g DNS entspricht, und ATP in einer Endkonzentration von 1,5mM wird das Gemisch 60 Minuten bei 34°C inkubiert. Anschließend wird ein Tropfen CHCl_3 zugegeben. Mitunter wird die Reaktion vorher durch Verdau der restlichen DNS mit DNase I (50 μ g/ml, 37°C, 10 Min.) gestoppt. Der Phagentiter des Gemisches wird durch Plattieren auf Su 70 und auf Su70(sie) ermittelt. Auf Su 70 wachsen sowohl die Phagen, die bereits in den Extrakten enthalten waren (background-Phagen) als auch die in vitro entstandenen. Auf Su70(sie) vermehren sich nur die, die durch in vitro-Verpackung der zugegebenen DNS mit dem Genotyp P22 am-Limm gebildet wurden.

am1 am13 + am2 am13 bedeutet, daß individuell präparierte Extrakte gemischt wurden, von denen einer mit am1 am13 infiziert wurde, der andere mit am2 am13. In derselben Weise werden alle anderen Kombinationen im Text bezeichnet, wie am2 (am13) + am5 (am13) oder am2 (am13) + am3.

6.26. Isolierung von Proheads

Eine log-Kultur von LT2 wird mit einer am2- oder am3-Mutante infiziert (moi=3), 90 Minuten (am2 am13) bzw. 20 Minuten (am3) lang belüftet, anschließend im Eisbad abgekühlt und die infizierten Zellen abzentrifugiert (sorvall-Zentrifuge, GS 3-Rotor, 6000rpm, 4°C). Das

Pellet wird in 1/250 Volumen Tris-Puffer pH 7,4 aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dreimaligen Einfrieren und Auftauen wird DNase I (Endkonzentration 60Ug/ml) zugegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert, um die DNS zu verdauen. Anschließend wird in der Sorvall-Zentrifuge im Rotor SS 34 15 Minuten lang mit 8500rpm (12000g) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird auf einen linearen 10 bis 30%igen Sucrosegradienten gegeben. Der Gradient wurde präpariert, indem in einem 30ml Cellulosenitratröhrchen 20%ige Sucroslösung bei -20°C eingefroren wurde und vor Gebrauch über Nacht bei 4°C aufgetaut wird. Hierbei stellt sich der lineare Gradient ein. Zentrifugiert wird in der Ultrazentrifuge im Rotor SW 27.1, 25000g, 5°C, 160 Minuten. Nach dem Lauf ist eine Bande, die die proheads enthält zu erkennen. Sie wird durch eine Kanüle, die von der Seite in das Röhrchen gestochen wird, entnommen und über Nacht gegen Tris-Puffer dialysiert.

6.27. Bestimmung der Proteinkonzentration der proheads nach Sedmak 1977

Bestimmt wird die Proteinkonzentration einer Lösung durch Vergleich der Färbung von Lösungen bekannter Proteinkonzentration mit Commassie Brilliant Blue in Perchlorsäure. Als Eichprotein wird Bovine Serum Albumin (BSA) verwendet. Durch entsprechende Verdünnung einer Stammlösung werden Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt: 2mg, 1,5mg, 1mg, 750µg, 500µg, 250µg, 125µg, 100µg, 50µg BSA/ml. 20µl dieser Lösungen werden auf einer Tüpfelplatte jeweils mit 500µl einer Lösung von Commassie Brilliant Blue in Perchlorsäure gemischt. Es entstehen je nach Proteinkonzentration unterschiedliche Blaufärbungen. Anschließend werden 20µl der Proheadlösung mit 500µl CBB-Lösung gemischt und die Blaufärbung mit den Eichlösungen verglichen. Auf diese Weise kann in etwa die Proteinkonzentration bestimmt werden.

6.28. Bestimmung der Dichte von Phagen mit einem linearen CsCl-Gradienten

Ein 5ml-Cellulose-Nitrat-Röhrchen wird mit einer CsCl-Lösung der Dichte $1,5\text{g/cm}^3$ gefüllt. Die Dichte der Lösung wird mit dem Refraktometer eingestellt. Anschließend werden 0,1ml der Phagenprobe des Phagen, dessen Dichte bestimmt werden soll, und 0,1ml eines Referenzphagen (H5) aufgeschichtet, und in der Ultrazentrifuge im Rotor SW 50.1 bei 4°C mit 35000rpm für 24 Stunden zentrifugiert. Hierdurch stellt sich ein linearer CsCl-Gradient ein, der von etwa 1,53 bis 1,49 reicht. Nach dem Lauf wird das Röhrchen von unten mit einer Kanüle angestochen und jeweils 6 Tropfen in einem Wassermann-Röhrchen aufgefangen. Von diesen Fraktionen wird die Dichte im Refraktometer bestimmt, außerdem die Titer der Referenzphagen und des zu prüfenden Phagen. In einer zeichnerischen Darstellung, in der Fraktionen bzw. deren Dichte die Abzisse bildet, der Phagentiter die Ordinate, ergibt sich eine Kurve mit einem deutlichen Maximum. Die Gipfel-Fraktion, gibt die Dichte der Phagen an.

6.29. Spreiten der DNS zur elektronenoptischen Untersuchung (Davis et al. 1971)

Präparation der Hypophase:

100% Formamid 10ml

0,5M Tris-HCl, 0,005M EDTA 2ml

Die Lösung wird mit entionisiertem H_2O auf 100ml aufgefüllt und mit 1N HCl auf pH 8,7 eingestellt. Die Lösung wird in eine PVC-Schale gefüllt.

Ansatz zum Spreiten:

30% Formamid (destilliert, 2x umkristallisiert),
in Tris/EDTA pH 7,4 25 μl

H_2O , entionisiert 19 μl

DNS in Tris/EDTA pH 7,4 5 μl
(Endkonz. 0,5 $\mu\text{g/ml}$)

cyt c (5 $\mu\text{g/ml}$), 1 μl

wird kurz vor dem Spreiten zugegeben.

Auf die Hypophase wird etwas Talkum-Puder verteilt und die DNS-Probe vorsichtig an einer Mikropipette entlanglaufend aufgebracht. Der entstehende Film wird mit den grids (300 mesh), die mit einem Parlodiumfilm (3% w/v in Amylacetat) überzogen sind, aufgefischt.

Kontrastierung:

Kontrastiert wird mit Uranylacetat. Hierzu werden 10-20 μ l einer Stammlösung (0,005M UA in 0,05M HCl) in 10ml 90%igen Äthanol gegeben. Das grid mit dem Spreitungsfilm wird 30 Sekunden in einen Tropfen dieser Lösung gehalten, anschließend 10 Sekunden in 90%iges Äthanol und 10 Sekunden mit Isopenten gewaschen. Getrocknet wird das grid unter einer Halogenlampe. Dann wird mit Platin in einer Bedampfungsanlage bedampft.

6.30. Markierung von H5-DNS durch Nick Translation

1. Markierung

a. Vor der Markierung werden die radioaktiven Triphosphate (α -AT³²P, spez. Aktivität 2000-3000 Ci/mmol, 1mCi/ml) über Nacht werden bei 4°C getrocknet. Verwendet werden 50 pmol pro 100 μ l Ansatz, Endkonzentration des Triphosphats 10^{-7} bis 10^{-6} M im Reaktionsgemisch.

b. Das Markierungsgemisch besteht aus:

- restlichen unmarkierten Triphosphaten in zehnfacher Konzentration gegenüber dem markierten. Berechnet werden kann die Konzentration, indem die Extinktion der jeweiligen Triphosphate gemessen wird und in die Formel:

$$c = \frac{E}{\epsilon \times 10^3}$$

E=gemessene Extinktion

ϵ =Extinktionskoeffizient

c=Konzentration

eingesetzt wird.

- 1 μ g H5-DNS in 10mM Tris-HCl, pH 8
- 10 μ l Nicktranslation-Puffer (10x konzentriert)

- 0,5-1 μ l DNS-Polymerase I (1 Einheit)

Das Ganze wird zu den markierten Triphosphaten gegeben und auf 100 μ l aufgefüllt.

c. Das Gemisch wird zwei Stunden bei 15°C inkubiert.

d. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 μ l 0,5M EDTA gestoppt.

e. Der Einbau wird geprüft, indem 1 μ l des Gemisches auf einen Glasfaserfilter aufgetragen, dreimal mit Fällpuffer gewaschen, getrocknet und im Szintillationszähler gezählt wird. Die Messung ergibt die Gesamtmenge von ^{32}P . Außerdem wird 1 μ l der Probe entnommen, auf einem Glasfaserfilter mit 1ml Fällpuffer und 50 μ l einer Lösung von Heringsperma-DNS (entspricht 100 μ g) versetzt. Langsam werden 5ml Fällpuffer zugegeben und abgesaugt. Dann wird mit 5ml Äthanol nachgewaschen, das Filter getrocknet und in Szintillationsflüssigkeit gezählt. Die Messung ergibt den Wert für eingebautes ^{32}P .

2. Reinigung

Das nicht eingebaute AT ^{32}P wird durch eine Sephadex-Säule (Sephadex G50 in 10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA) abgetrennt. Die Säule ist etwa 12cm hoch und hat einen Durchmesser von etwa 0,5cm (10ml-Pipette, silikonisiert mit 50%igem Dichlormethylsilan in CHCl_3). Die Säule wird mit etwa einem Säulenvolumen Säulenpuffer vorgewaschen. Anschließend wird die radioaktive Probe eingebracht und, nachdem sie in die Säule eingedrungen ist, mit Säulenpuffer nachgefüllt. Es werden Fraktionen zu 6 Tropfen in Nethlerbechern aufgefangen und nach Cerenkov gemessen. Den ersten radioaktiven peak bildet die DNS, kurz darauf folgen die Triphosphate. Die Fraktionen mit der markierten DNS werden gesammelt und weiterbehandelt. 1 μ l wird auf einen Glasfaserfilter gebracht, gefällt und in Szintillationsflüssigkeit gezählt.

Die DNS-Probe wird durch mehrmaliges Fällern mit Alkohol (6.10.) weiter gereinigt und konzentriert. Nachdem noch einmal die Radioaktivität bestimmt ist, wird die DNS im Verpackungsansatz eingesetzt.

C. Ergebnisse

C.I. Entwicklung eines in vitro-Systems zur Verpackung von DNS

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen über die DNS-Verpackung beim Phagen P22 mit Hilfe eines zu entwickelnden in vitro-Systems durchgeführt werden.

Schon 1973 war von Kaiser und Masuda (1973) solch ein experimenteller Ansatz für den Phagen λ beschrieben worden. Sie machten sich dabei die Existenz conditional letaler Mutanten, insbesondere am-Mutanten, zunutze.

1. Verpackungsversuche mit einem Extrakt als DNS-Donor

1.1. Experimenteller Ansatz

Der experimentelle Ansatz nach Kaiser und Masuda sieht folgendermaßen aus: Es werden Wildtypzellen mit am-Mutanten des Phagen infiziert und inkubiert. Strukturen bzw. Enzyme, für die das mutierte Gen kodiert, können nicht oder nur unvollständig gebildet werden. Dadurch wird die Phagenreifung auf der Stufe blockiert, auf der das Genprodukt in seiner korrekten Form notwendig wird, sei es als Strukturelement oder als Komponente, die zwar nicht in den Phagen eingebaut wird, aber eine sonstige unerläßliche Funktion bei der Morphogenese ausübt. Es entstehen Vorläuferstrukturen des Phagen, wie z. B. gefüllte Köpfe bei einer Mutation in einem Strukturgen des Schwanzes. Die Mutationen können aber auch zu aberranten Strukturen führen, z. B. zu ungeordneter Aggregation verschiedener Produkte wie bei einer Infektion mit einer Mutante im Hauptstrukturgen des Kopfes.

Vor Lysis der infizierten Zellen werden diese durch Zentrifugation 100- bis 500fach konzentriert. Anschließend werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor einem Komplementationversuch werden zwei solcher Ex-

trakte, die mit unterschiedlichen Phagenmutanten infiziert wurden, mit einer geeigneten Methode aufgeschlossen. Die beiden Extrakte werden gemischt, falls erforderlich mit ATP als Energiequelle, mit Spermidin und Mg^{2+} ergänzt und inkubiert. Die Fertigstellung der Phagen, deren Titer auf einem geeigneten Indikator bestimmt wird, erfolgt im zellfreien System. Enthält der eine Extrakt z. B. nur gefüllte Köpfe, der andere nur Bodenplatten, da die Zellen mit einer Kopfmutante infiziert worden waren, können sich völlig intakte Partikel bilden, wenn man die beiden Extrakte mischt (Israel, Anderson Levine 1967).

1.2. Geeignete Mutanten

Da in dem zu entwickelnden in vitro System vorwiegend Untersuchungen zur DNS-Verpackung und zu den Funktionen der beteiligten Genprodukte durchgeführt werden sollten, mußten entsprechende Mutanten zur Extrakterstellung verwendet werden:

Überlange DNS, die in vivo Vorläuferstruktur der reifen DNS ist, bleibt bei Infektionen von Wildtypzellen mit den am-Mutanten 1, 2, 3, 5 und 8 erhalten (Botstein et al. 1973). Solche Extrakte können als DNS-Donor wirken. Am2- und am3-Infektionen liefern außerdem intakte proheads. Am2- und am3-Extrakte können also sowohl als DNS- als auch als prohead-Donor verwendet werden. Die jeweils fehlenden Proteine gp2 und gp3 müssen von einem zweiten Extrakt, z. B. am5 oder am8, in aktiver Form beige-steuert werden.

Um eine möglichst hohe Konzentration der Vorstufen zu erhalten, wurde in die verwendeten Verpackungsmutanten zusätzlich eine am-Mutation im Lysisgen 13 eingekreuzt. Die Mutation in Gen 13 läßt zwar die normale Produktion von Lysozym zu (für das Gen 19 kodiert), verhindert aber

das Öffnen der Zellen (Botstein, Chan, Waddell 1972). In Infektionen mit einer amx am13-Mutante werden alle nicht betroffenen Phägenprodukte und Vorläuferstrukturen bis zu drei Stunden nach Infektion synthetisiert und akkumuliert (Botstein, Waddell, King 1973; King, Lenk, Botstein 1973). Bei Verwendung solcher Doppelmutanten wurde allerdings nur 60-90 Minuten inkubiert, da die Mutation in Gen 13 sehr leaky ist. Beim normalen Phagenzyklus beginnt die Lyse bereits nach etwa 20 Minuten bei 37°C und nach etwa 40 Minuten sind alle Zellen geöffnet. Dem mußte bei der Verwendung derjenigen Mutanten Rechnung getragen werden, in die nicht am13 eingekreuzt wurde. Die Zellen mußten bereits vor Beginn der Lyse konzentriert werden.

1.3. Aufschluß der Extrakte

Auch die Weise, die konzentrierten infizierten Zellen zu öffnen, kann Einfluß auf die Effektivität der Komplementation haben. Je nach Zielsetzung sind sehr unterschiedliche Methoden, um Zellen aufzuschließen, gebräuchlich:

- a. Die hochwirksamen Detergentien SDS und Sarcosyl werden auch in unserem Labor bevorzugt zur Freisetzung von DNS eingesetzt. Für die Gewinnung von Zellextrakten für die in vitro-Verpackung scheiden sie jedoch aus, da sie alle biologischen Reaktionen, die im Gemisch der Extrakte ablaufen sollen, unterbinden
- b. mildere Detergentien wie Brij 58 und Na-Deoxycholat sind von Worcel zum Aufschluß von Zellen verwendet worden (Worcel, Burgi 1972)
- c. häufig werden infizierte *Salmonella thyphimurium* Zellen mit Lysozym nach EDTA Vorbehandlung geöffnet.
- d. Chloroform schließt ebenfalls infizierte Zellen auf, Phagen sind dagegen unempfindlich gegenüber Chloroform

e. in Komplementationsversuchen mit dem Phagen werden die infizierten E.coli-Zellen mehrmals in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut

f. es ist auch möglich, die Zellen mechanisch zu zertrümmern. Hierzu eignet sich ein Zellaufbrechgerät von PARR, in dem die Zellen unter hohen Druck gesetzt und anschließend dekomprimiert werden. Hierbei zerreißen die Zellen

Mit den Methoden b. bis f. wurden Wildtyp-Zellen, die mit am8-bzw. mit am9-Mutanten infiziert worden waren, aufgeschlossen. Gp9 ist das Protein, aus dem die Bodenplatte aufgebaut ist, gp8 das core-Protein von P22. In am8-Extrakten sind nur aberrante Kopfstrukturen enthalten, dafür aber fertige Bodenplatten. Am9-Exktrakte liefern dagegen intakte DNS-gefüllte Köpfe, aber keine Schwänze. Ein am8- und ein am9-Extrakt wurden jeweils gemischt und 30 Minuten bei 34°C inkubiert. Die Titer der einzelnen Extrakte und der inkubierten Gemische wurden auf Su 70, ein Stamm der die am-Mutation supprimiert, titriert. Kontrolle war ein Gemisch aus infizierten Zellen, die keinem Aufschlußverfahren unterworfen worden waren.

Tab. 1: Verschiedene Methoden des Extraktaufschlusses mit anschließender Komplementation

Extrakte	Aufschlußmethoden					
	unbehandelt	CHCl ₃	Worcel-Deterg.	Komp.-Dekomp.	Lysozym EDTA	Einf.-Auftauen
am8	6,0x10 ⁸	3,0x10 ⁸	1,7x10 ⁸	2,1x10 ⁸	3,4x10 ⁸	4,0x10 ⁸
am9	4,2x10 ⁸	2,1x10 ⁸	1,6x10 ⁸	6,6x10 ⁸	1,9x10 ⁸	3,5x10 ⁸
am8+am9	9,0x10 ⁸	4,1x10 ¹⁰	1,3x10 ¹¹	1,2x10 ¹¹	2,0x10 ¹⁰	5,4x10 ¹⁰

Wegen der Leakyness der am-Mutationen bringen die einzelnen Extrakte relativ hohe Titer (etwa 10^8 infektiöse Partikel). Im Teil 1.2. wird näher auf diese "background-Phagen" eingegangen. Außer bei der Kontrolle liegt der Titer der Extraktgemische dennoch deutlich über dem der Einzelextrakte. Köpfe und Bodenplatten aus den verschiedenen Extrakten haben sich nach Aufschluß der Zellen und Mischen zweier Extrakte durch einen self-assembly Schritt (siehe Einleitung) zu fertigen Phagen zusammengefügt.

Es werden offenbar mit jeder Methode genügend Phagenprodukte freigesetzt. Der Aufschluß nach Worcel und mit dem PARR- Zellaufbrechgerät liefern die höchsten Werte. Beide haben aber Nachteile. Beim Kopf-Schwanz-Assembly sind keinerlei Enzymaktivitäten gefordert. In Reifungsschritten, in denen DNS verpackt und geschnitten wird etc., ist aber nicht auszuschließen, daß Brij 58 und Na-Deoxycholat hemmend wirken. Es ist bekannt, daß oberflächenaktive Stoffe Proteine in ihrer Struktur denaturieren, wobei sie mehr oder weniger von ihren Bindungspartnern getrennt werden (Wallach, Knüfermann 1973). Das Freisetzen von aktiven Enzymen ist mit dieser Zellaufschlußmethode nicht gewährleistet. Dasselbe gilt auch für einen Aufschluß mit Chloroform. Für das Öffnen der Zellen mit Hilfe von Kompression-Dekompression konnte Kreutinger in unserem Labor (Diplomarbeit) zeigen, daß DNS-Konkatemere, die bei einem in vitro-Ansatz für die DNS-Verpackung notwendig wären, nicht intakt bleiben. Am geeignetsten erschien deshalb der Aufschluß der Zellen durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Diese Methode ist frei von störenden Einflüssen zugegebener Detergentien, schließt aber die infizierten Zellen fast genauso effektiv auf, wie die anderen Verfahren. In Versuchen mit dem Phagen λ werden die Phagen-DNS und die Kopfvorläuferstrukturen nicht zerstört (Kaiser, Masuda 1973; Hohn, Hohn 1974;

Hohn 1975), was annehmen läßt, daß dies auch für P22 zutrifft.

Um möglichst quantitatives Öffnen der Zellen zu erreichen, wurde geprüft, ob die Häufigkeit des Einfrierens der Zellen Einfluß auf das Freisetzen von Phagen aus infizierten Zellen und deren Überleben hat.

Tab. 2: Einfluß der Häufigkeit von Einfrieren-Auftauen auf die Freisetzung von Phagen aus mit am13 infizierten Zellen

	CHCl ₃ unbehand.		Häufigkeit von Einfrieren-Auft.			
			1x	2x	3x	4x
pfu/ml	$6,2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$	$6,1 \times 10^9$
%	100%	0,2%	30%	60%	99%	99%

Im Versuch, dessen Ergebnis Tab. 2 zusammenfaßt, wurden nichtpermissive Zellen mit am13 infiziert, inkubiert und unterschiedlich oft eingefroren und aufgetaut. Bezogen wurden die auf Su70 erhaltenen Titer auf den Titer, der bei Aufschluß der Zellen mit CHCl₃ gewonnen wurde (=100%). Einmaliges Einfrieren reicht offenbar nicht aus, alle Zellen zu öffnen. Es sind nur 33% aller Phagen freigesetzt, bei dreimaligem Einfrieren 99%. Offenbar werden die Phagen auch bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen nicht geschädigt. Man erhält fast dieselben Werte wie beim Öffnen der Zellen mit Chloroform, gegen das die Phagen P22 unempfindlich sind. In allen weiteren Versuchen wurden daher die infizierten Zellen dreimal eingefroren und aufgetaut.

2. Illegitime Vermehrung der background-Phagen

2.1. Auftreten von background-Phagen

Plattiert man die einzelnen Extrakte, bevor man sie mischt, auf den für die am-Mutanten permissiven Suppressor-Stamm Su70, zeigen diese einen recht hohen Titer (siehe Tab. 1). Er liegt höher als die Zahl der Phagen, die bei der Infektion der Zellen nicht adsorbiert hatten und trotz Abzentrifugieren der Zellen noch vorhanden sind. Man erhält nämlich nach Abzentrifugieren der infizierten Zellen, wobei der größte Teil der nicht-adsorbierten Phagen im Überstand verbleiben, und Aufnehmen des Pellet in kleinem Volumen Puffer nur maximal 5×10^6 freie Phagen pro Milliliter der infizierten Zellen bei Titration auf Su 70., egal mit welcher Phagen-am-Mutante infiziert worden war. Schließt man dann diese Zellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf und plattiert auf Su70, liegen die Titer der Phagen immer erheblich höher, meist zwischen 10^8 und 10^9 Phagen/ml. Wurden dieselben Extrakte auf den für am-Mutanten nichtpermissiven Wildtypstamm LT2 plattiert, lagen die Werte deutlich niedriger. Ein Beispiel zeigt Tab. 3, in der die Titer für am8- und am9-Extrakte sowie ein Gemisch aus beiden auf Su70 und LT2 angegeben sind.

Tab. 3: Komplementation in einem Gemisch von am8+am9; Anteil der Rückmutanten

Extrakte	pfu/ml auf LT2	pfu/ml auf Su70	Häufigkeit der Rückmutanten
am8	$2,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{-2}$
am9	$1,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^8$	$6,3 \times 10^{-5}$
am8+am9	$6,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^{-5}$

Auf LT2 können nur Rückmutanten wachsen. Die Phagen, die in den infizierten Zellen gebildet werden, sind also vorwiegend am-Mutanten. Sie werden im weiteren als "background-Phagen" bezeichnet. Als Grund für diesen "Background" der Extrakte ist eine illegitime Vermehrung der am-Mutanten anzunehmen, die durch immer vorkommende Ablesefehler verursacht wird. Möglicherweise wird das am-Codon nicht als Terminator gelesen, sondern als Triplett für irgendeine Aminosäure. Die Proteinsynthese bricht nicht ab, sondern es entsteht ein zwar durch Einbau einer falschen Aminosäure verändertes, aber funktionsfähiges Protein. Die Häufigkeit dieser Fehler ist sehr niedrig und in einem normalen Lysat nicht feststellbar. Rechnet man den background-Titer auf die Zahl der infizierten Zellen um, erhält man eine Wahrscheinlichkeit von 5×10^{-3} pro infizierte Zelle oder 2×10^6 background-Phagen pro ml Lysat. Durch das starke Konzentrieren der Extrakte werden sie erkennbar.

2.2. Einfluß der background-Phagen auf die Auswertung der Versuche

Bei einer so effektiv ablaufenden Komplementation wie das self-assembly von Köpfen und Bodenplatten stört dieser background nicht. Der Titer des Gemisches ist bei weitem höher als die Werte der Einzelnextrakte (vgl. Tab. 1 und 3). Führt man dagegen Versuche durch, die noch enzymatische Schritte in vitro erfordern, liegt der Titer der Gemische auf Su70 nicht oder nur wenig über dem der einzelnen Extrakte, wie Tab. 4 zeigt. Im Versuch, der in Tab. 4a zusammengefaßt ist, wurden ein am1-Extrakt und ein am2-Extrakt gemischt. Am1 bildet im nichtpermissiven Stamm LT2 proheads, denen gp1 fehlt, am2-Mutanten synthetisieren vollständige proheads. In beiden Infektionen wird Phagen-DNS nicht geschnitten

und verpackt. Im Versuch erhielt man für die einzelnen Extrakte und die Gemische fast gleiche Phagentiter. Es war also nicht zu entscheiden, ob in vitro DNS verpackt wurde und dadurch reife Phagen entstanden waren.

Tab. 4: Komplementationsversuche mit verschiedenen Extraktkombinationen

Extrakte	pfu/ml auf LT2	pfu/ml auf Su70
a. am1	$3,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^8$
am2	$5,3 \times 10^4$	$5,0 \times 10^8$
am1+am2	$1,6 \times 10^5$	$6,0 \times 10^8$
b. am5	$1,7 \times 10^7$	$3,3 \times 10^9$
am10	$8,0 \times 10^4$	$6,1 \times 10^7$
am5+am10	$5,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$ (Genotyp am5)
		$1,4 \times 10^9$ (Genotyp am10)

Tab. 4b zeigt das Ergebnis für eine Kombination aus einem am5-Extrakt, dem die Kopfstrukturen fehlen, und einem am10-Extrakt, der aus unvollständigen, DNS-gefüllten Köpfen und Köpfen, die ihre DNS wieder verloren haben, besteht. In vitro ist es möglich, die instabilen, DNS-haltigen Köpfe aus dem am10-Extrakt durch Komplementation mit einem am5-Extrakt zu stabilisieren. (Botstein 1973). Dabei können nur Phagen entstehen, die den Genotyp am10 haben. In meinem Versuch lag der Titer des Gemisches ($2,6 \times 10^9$) etwas unter dem des am5-Extrakts ($3,3 \times 10^9$). Nur durch genetische Prüfung der entstandenen plaques konnte die in vitro-Reaktion nachgewiesen werden. Die Hälfte aller pfu des Gemisches auf Su70 waren am10-Mutanten, nämlich $1,4 \times 10^9$. Der einzelne am10-Extrakt hatte dagegen nur einen Titer von 6×10^7 . Es waren also

DNS-gefüllte instabile Köpfe aus dem am10-Extrakt durch den am5-Extrakt in vitro stabilisiert und vervollständigt worden, auch wenn das durch einfaches Plattieren des Gemisches auf Su70 wegen des hohen background-Titers des am5-Extrakts nicht nachzuweisen war.

2.3. Einfluß der Inkubationsdauer auf den Titer der "background-Phagen"

Wie unter 1.2. ausgeführt, wurde in die meisten verwendeten am-Mutanten am13 eingekreuzt, um eine Akkumulation von Phagenvorstufen bei der Herstellung von Extrakten zu ermöglichen. Um zu prüfen, ob auch die Zahl der background-Phagen mit der Inkubationszeit zunimmt, was zu erwarten ist, falls sie durch Ablesefehler zustande kommen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Es wurden Aliquots von LT2-Kulturen, die mit am2 (ungeschnittene DNS, proheads) bzw. mit am5 (ungeschnittene DNS, keine Kopfstrukturen) infiziert waren, unterschiedlich lang inkubiert, bevor Extrakte durch Aufschließen der Zellen hergestellt wurden. Extrakte von am2 und am5-Infektionen mit der gleichen Inkubationsdauer wurden dann gemischt.

Tab. 5: Einfluß der Inkubationsdauer bei der Extrakt-herstellung auf die Zahl der background-Phagen am Beispiel eines Komplementationsversuchs mit einem am2+am5-Gemisch

Extrakte	Dauer der 45 Min.	pfu/ml Inkubation nach Infektion	
		60 Min.	90 Min.
am2 am13	$3,1 \times 10^8$	$5,9 \times 10^9$	$3,5 \times 10^{10}$
am5 am5 am13	$3,4 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$	$4,8 \times 10^9$
am2 am13+ am5 am5 am13	$3,0 \times 10^8$	$5,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$

Wie Tab. 5 zeigt nimmt der Titer der background-Phagen mit der Zeit der Inkubation nach Infektion zu. Der am2 am13-Extrakt enthält nach 45 Minuten 3×10^8 background-Phagen/ml, nach 90 Minuten bereits das 100fache. Ähnlich schnelle Zunahme der Extraktphagen ist auch beim am5 am13-Extrakt zu beobachten, bei dem allerdings die Zahl der Phagen insgesamt niedriger ist. Nach Mischen der Extrakte ist in keinem Fall eine in vitro-Reaktion nachzuweisen. Selbst wenn durch die Akkumulation der Phagenvorstufen bei längerer Inkubation nach Infektion möglicherweise mehr in vitro-Phagen entstanden wären, ist das nicht festzustellen, da dies mit einer Zunahme der Zahl der background-Phagen einhergeht.

Sollen also in vitro-Reaktionen nachgewiesen werden, die nur mit geringer Häufigkeit ablaufen, wie für DNS-Verpackung anzunehmen ist, muß der störende background gesenkt werden.

2.4. Versuche, den Titer der background-Phagen zu senken

Es bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, den background zu erniedrigen:

In Tab. 4 war eine Einfachmutante in Gen 5 verwendet worden, in Tab. 5 hingegen eine Doppelmutante. Vergleicht man die Werte der background-Phagen, zeigt sich, daß eine Mehrfachmutante einen niedrigeren background bildet als die Einfachmutante. Diese erreichte bei 40minütiger Inkubation bei 27°C einen Titer von $3,3 \times 10^9$, Mutante am5 am5 am13 (Tab. 5) dagegen erst nach 90 Minuten bei 37°C einen ähnlichen Wert ($4,8 \times 10^9$). Für empfindliche in vitro-Prozesse ist der background einer solchen Doppelmutante jedoch immer noch zu hoch.

Die Reduzierung des background ist auch durch physikalische Methoden denkbar. Zerstörung durch Hitze ist nicht

anwendbar, da P22 zu den hitzeresistenten Phagenstämmen gehört (Boyd 1950). Die Abtötung der Phagen durch UV-Bestrahlung erwies sich ebenfalls als untauglich. Außerdem besteht die Gefahr, daß durch diese Methode die zu verpackende DNS geschädigt wird.

Tab. 6: UV-Bestrahlung eines H5-Lysates und eines am2 am13 Extrakts (2 J/m²/sec)

	0 Min.	Dauer der Bestrahlung	
		120 Sek.	7 Min.
H5-Lysat	1,4x10 ¹¹	4,0x10 ⁹	
am2 am13 - Extrakt	9,0x10 ⁷	5,2x10 ⁷	2,0x10 ⁷

Bestrahlte man ein Lysat von Wildtypphagen (H5) 120 Sekunden lang mit 2J/sec/m² sank der Titer auf etwa 3% des Ausgangstiters. Bestrahlte man aber einen Extrakt, sank der Titer selbst in 7 Min. nur geringfügig, vermutlich weil die Strahlung vorwiegend durch Zellfragmente etc. absorbiert wurde.

Korrekterweise hätte für diesen Versuch als Indikator für die Titration der Phagen eine rec⁻- oder eine uvr⁻-Mutante verwendet werden müssen, um Reparatur der bestrahlten und geschädigten DNS auszuschließen. Da aber der H5-Titer bei Bestrahlung trotz rec⁺-Bedingungen deutlich sank, dürfte dieser Mangel des Experiments unerheblich für die Aussage sein, daß das Verfahren zur Senkung des background-Titer nicht geeignet ist.

Es wurde außerdem versucht, die background-Phagen an Zellen und Zellfragmente von LT2 zu adsorbieren. Läßt man Phagen eines normalen Lysates (H5) an Zellen einer log-Kultur adsorbieren, reicht bei einer Adsorptionszeit von 5 Min. bereits die gleiche Zahl von Bakterien aus, um den Titer um zwei Zehnerpotenzen zu senken (Fig. 4).

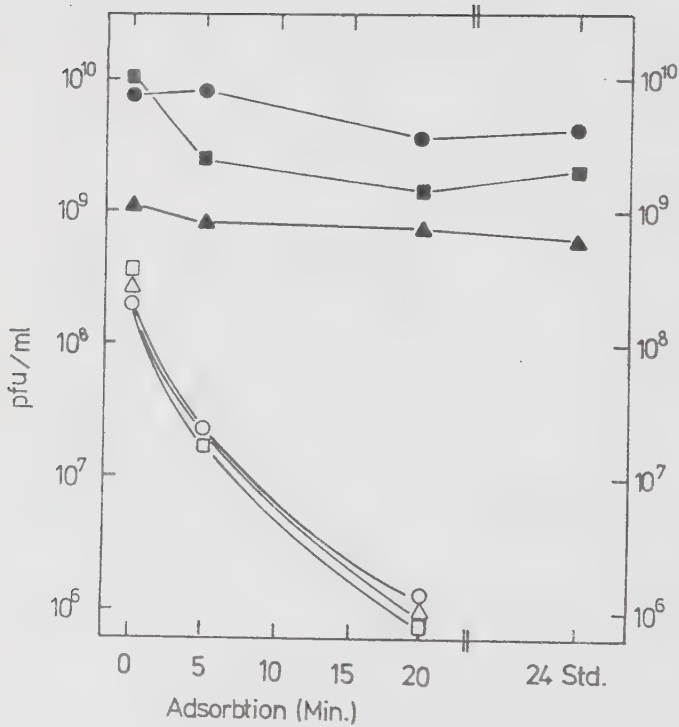


Fig. 4: Adsorption eines H5-Lysats und eines am2 am13-Extrakts an Lt2-Kulturen:
 Zur Adsorption von H5 wurde eine log-Kultur in verschiedenen Verdünnungen verwendet : ○—○—○ 3×10^8 Zellen / ml, △—△—△ $7,5 \times 10^8$ Zellen/ml, ■—■—■ 3×10^9 Zellen/ml
 Die Phagen des Extrakts wurden an Zellen einer Übernachtskultur (▲—▲—▲), einer log-Kultur (■—■—■) und an abgetötete Zellen einer ÜK (●—●—●) adsorbiert

Phagen des Extrakts, hier am² am¹³, lassen sich dagegen auch bei längerer Adsorptionszeit nicht an die Zellwände lebender oder abgetöteter LT²-Zellen binden. Es war also mit keiner dieser Methoden möglich, den Titer der background-Phagen im Extrakt ausreichend zu senken.

3. Verpackung exogener DNS

3.1. Experimenteller Ansatz

Da die background-Phagen der Extrakte das Erkennen von selten ablaufenden Reifungsprozessen in vitro unmöglich machen, mußte der Versuchsansatz geändert werden. Bei dem bisherigen Konzept diente einer der Extrakte oder auch beide als DNS-Donor. In Anlehnung an Experimente mit den Phagen λ und P2 (Hohn 1975; Kaiser, Masuda 1973; Pruss et al. 1974, 1975) sollten nun zwar zwei verschiedene Extrakte gemischt werden, die alle Phagenstrukturen und Enzyme, die für die Verpackung von DNS notwendig sind, beisteuern, ihre DNS aber sollte zerstört werden. Die zu verpackende DNS wird dem Extraktgemisch in gereinigter Form von außen zugegeben. Trägt sie entsprechende Marker, können die Phagen, die durch Verpackung dieser DNS entstehen, auf speziellen Indikatoren, auf denen die einzelnen Extrakt-Phagen nicht wachsen können, selektiv nachgewiesen werden.

3.2. Anforderungen an die DNS

Aus dieser Überlegung ergeben sich bestimmte Anforderungen an die zu verpackende DNS:

a. Wie in der Einleitung ausgeführt, wird angenommen, daß DNS in überlanger Form vorliegen muß, um verpackt zu werden. Mutanten in den Genen 1, 2 und 3 können DNS nicht schneiden. Dasselbe gilt für Mutanten in den Kopfgenen 5 und 8 (Botstein, Waddell, King 1973; Streisinger et al. 1967). Diese Mutanten eignen sich also, um gezielt DNS-

Konkatemere zu synthetisieren und zu isolieren. Wegen ihrer niedrigen Rückmutationsrate wurde für diese Arbeit eine am2-Mutante ausgewählt.

b. Da anzunehmen ist, daß die angestrebte in vitro-DNS-Verpackung ein sehr ineffektiver Prozeß ist, müssen die DNS-Konkatemere in großer Menge angeboten werden. Für die DNS-Gewinnung wurde deshalb eine am2 am13-Mutante verwendet. Inkubiert man einen nichtpermissiven Stamm nach Infektion mit einer solchen am2 am13-Mutante, akkumulieren die Zellen wegen der Defekte in Gen 2 und 13 konkatemere DNS. Erst nach 90 Min. Inkubation bei 37°C ist nach Botstein ein Abbau der DNS feststellbar (Botstein et al. 1973).

c. Wie oben angesprochen, sollen die Phagen, die durch Verpackung der zugegebenen DNS entstanden sind, eindeutig von denen der Extrakte unterscheidbar sein. Sie sollten auf einem Indikator wachsen können, auf dem sich die Mutanten der Extrakte nicht vermehren können. Die Mutante für die DNS-Gewinnung muß also einen zusätzlichen Marker tragen. Hierzu wurde in den Stamm am2 am13 die c-Immunitätsregion des Phagen L eingekreuzt. Der Phage L ist nahe verwandt mit P22, jedoch heteroimmun (Bedzek, Amati 1967). Das bedeutet, daß P22 auf L-lysogenen Stämmen wächst, nicht aber auf P22-lysogenen, ebenso wie L auf P22-lysogenen Zellen, nicht sich aber auf L-lysogenen vermehrt. Wie bei P22 wird auch beim Phagen L die Immunität über zwei Regionen genetisch kontrolliert: imm c und imm I. Beide Phagen können untereinander gekreuzt werden, wodurch unter anderem Rekombinanten des Typs imm c^L imm I^{P22} entstehen können. Solche Phagen mit hybrider Immunität wachsen - im Gegensatz zu den Elternphagen - sowohl auf L-lysogenen wie auf P22-lysogenen Indikatoren. Bei geeigneter Eltern- und Rekombinationauswahl können die hybrid-immunen Phagen noch am Mutationen des P22-Partners enthalten. Solche Rekombinanten wachsen dann auf Su70(L) und auf Su70(φie),

nicht jedoch auf dem nichtsupprimierenden Wildtypstamm LT2. Der Prophage des lysogenen Stammes Su70 muß sie⁻ sein, da bei P22 unabhängig von der Immunität durch den Repressor eine zusätzliche Funktion ausgebildet ist, die das Wachstum eines Überinfizierenden Phagen im lysogenen Stamm verhindert - sie für super-infection exclusion (Susskind et al. 1971). P22am-Mutanten, wie sie für die Infektion bei der Extrakterstellung verwendet werden, also auch die background-Phagen, können nicht auf Su70(sie) wachsen, da die Bildung des Repressors durch den Prophagen das verhindert. Auf Su70(sie) könnten sich nur noch P22 vir-Mutanten vermehren, die spontan in einer Häufigkeit von 10^{-9} auftreten (Bronson, Levine 1971, 1972). Da der background-Titer zwischen 10^8 und 10^9 liegt, dürften diese aber ohne Bedeutung sein.

Der Phagenstamm, der für die DNS-Gewinnung konstruiert wurde, hat folgenden Genotyp: am2 am13 c^L I^{P22} Partikel lassen sich mit den in Tab. 7 angegebenen Indikatoren nachweisen. Zum Nachweis der am-Mutationen wurden die bereits beschriebenen DB-Stämme verwendet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Mutante als 2·13·L bezeichnet.

Tab. 7: Titer der Phagen-Mutante am2 am13 c^L I^{P22} auf verschiedenen Indikatoren

Indikator	Su70	LT2	Su70(sie)	Su70(L)
Titer	$7,0 \times 10^{11}$	10^3	$6,6 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{11}$
Indikator	DB 122	DB 147	DB 5062	DB 5064
Titer	$< 10^3$	$4,0 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^{10}$	$< 10^3$

3.3. Gewinnung der DNS

Bei der Isolierung der DNS aus infizierten Zellen muß sehr schonend vorgegangen werden, da sie in überlanger Form erhalten bleiben soll. Botstein et al. beschreiben eine Methode, konkatemere DNS zu gewinnen, um ihre Länge auf Sucrosegradienten zu bestimmen (Botstein et al. 1973). Da die Zellen mit SDS behandelt wurden, ist sie für meine Zwecke nicht brauchbar. Ich mußte deshalb anders vorgehen: die infizierten Zellen wurden nach 40 bis 60 Min. Inkubation bei 37°C konzentriert und einmal vorsichtig mit Tris-gesättigtem Phenol für 10 Minuten gerollt. Anschließend wurde das Phenol durch Dialyse entfernt. Um zu testen, ob die DNS bei dieser Behandlung in überlanger Form erhalten bleibt, wurde die Infektion unter ^{14}C -Markierungsbedingungen vorgenommen und die DNS nach Phenolbehandlung auf einen linearen Sucrose-Gradienten gegeben.

Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer in dieser Weise isolierten bakteriellen DNS. Die Länge der erhaltenen Moleküle läßt sich wie in Material und Methoden unter 2.6.1. ausgeführt ist, berechnen. Als Referenz wurde ^3H -markierte H5-DNS mitzentrifugiert. Der Gipfel der ^3H -Impulse gibt die Sedimentationsstrecke (bzw. Fraktionsnummer) vom Meniskus des Gradienten aus an, die der DNS des reifen Phagen (H5) entspricht. Die errechneten Werte für die bakterielle DNS (^{14}C) zeigen, daß ein relativ großer Anteil der DNS in 5- bis 10-facher Phagengenomlänge erhalten bleibt. Die Methode ist also geeignet, große DNS-Moleküle zu isolieren.

Das Ergebnis für die Isolierung von ^{14}C -markierter

2 · 13·L -DNS nach Infektion eines nichtsupprimierenden Stammes sieht dagegen anders aus, wie Fig. 6 zeigt. Als Referenz diente wieder ^3H -markierte DNS aus reifen H5-Phagen. Der größte Teil der ^{14}C -DNS hatte

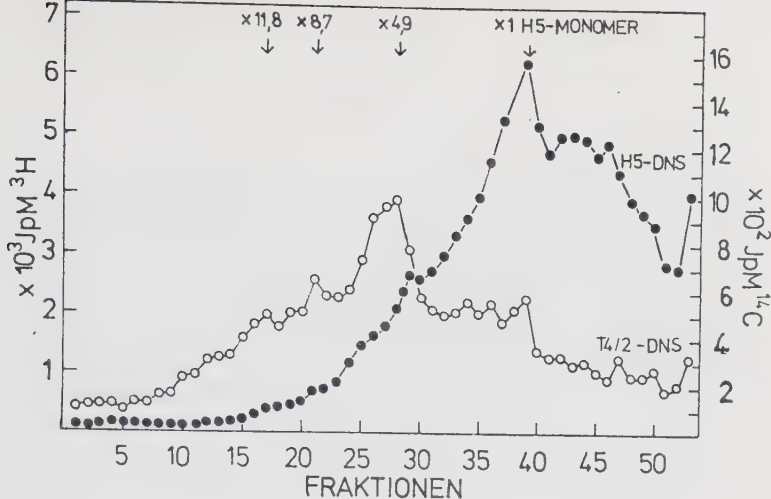


Fig. 5: Molekulargewichtsbestimmung einer Präparation von ^{14}C -markierter T4/2-DNS (o-o-o) in einem neutralen linearen Sucrose-Gradienten (5% - 20%). ^3H -markierte H5-DNS diente als Referenz (■-■-■). Die Errechnung der Molekulargewichte der DNS in den Gipfelfractionen ist in Material und Methoden 6.20 beschrieben.

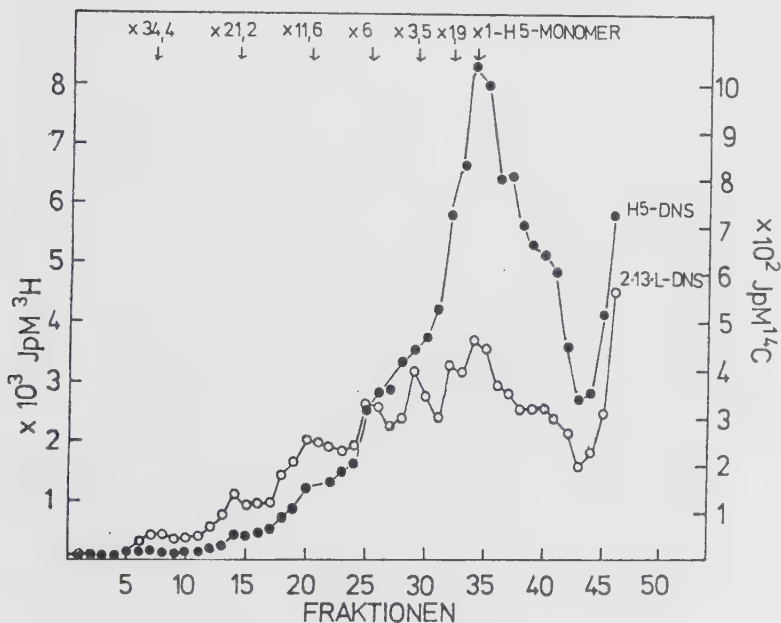


Fig. 6: Molekulargewichtsbestimmung von ^{14}C -markierter Phagen-DNS nach Infektion des nicht-supprimierenden Stamms LT2 mit am2 am13 c⁻ IP22 und 60 Minuten Inkubation bei 37°C (o-o-o). Als Referenz diente ^3H -markierte H5-DNS (■-■-■). Die Errechnung der Molekulargewichte der DNS in den Gipfelfractionen ist in Material und Methoden 6.20 be-

etwa einfache Phagengenomlänge oder war zu noch kleineren Bruchstücken abgebaut. Nur wenig DNS blieb als längere Moleküle erhalten. Möglicherweise sind in dieser Form viele Einzelstrangbrüche vorhanden und machen die Moleküle besonders empfindlich. Da es auch nicht auszuschließen ist, daß die zelleigenen Nukleasen trotz der nukleasehemmenden Bedingungen für den Abbau verantwortlich waren, wurde für weitere DNS-Gewinnungen der bakterielle Wirt DB 5575 (=endI) verwendet, in dem kaum endonukleolytische Aktivität auf P22-DNS nachzuweisen ist (Schumann, Bade 1977). Prüfte man DNS, die aus solchen Infektionen isoliert wurde, mittels Agarose-Gelelektrophorese, zeigte sich jedoch, daß auch diese Präparationen abgebautes Material enthalten. Der Anteil variiert stark von Präparation zu Präparation.

3.4. Verpackungsexperimente

Das Konzept für Versuche, in denen DNS-Verpackungsschritte *in vitro* untersucht werden sollen, sieht also folgendermaßen aus: Zwei verschiedene Extrakte, die gemeinsam alle notwendigen Vorläuferstrukturen und Enzyme liefern, werden gemischt, nachdem ihre DNS durch mehrmaliges Aufziehen in einer Spritze zerstört wurde. Das soll eine Konkurrenz der extrakteigenen DNS mit der exogenen DNS verhindern. Anschließend wird DNS zugegeben, die aus dem am2 am13 c^L-infizierten end⁻-Stamm DB 5575 isoliert wurde. Nach Ergänzung mit den von Kaiser und Masuda beschriebenen Stoffen ATP, Spermidin und Mg-Ionen und 60' Inkubation bei 34°C können Partikel nachgewiesen werden, die *in vitro* entstanden sind.

Tab. 8: Verpackung exogener DNS in einem am2+am5 bzw. am1+am2 Extraktgemisch

Extrakte	pfu/ml auf Su70(sie)			
	auf Su70	-DNS	DNS(15µg)	DNS(vorinku- biert m.DNaseI)
a. am2 am13 +am5 am5	$1,4 \times 10^9$	<10	$1,0 \times 10^4$	<10
b. wie a)	$1,5 \times 10^9$	<10	$2,7 \times 10^5$	<10
c. am1 am13+ am 2 am13	$7,3 \times 10^8$	<10	$6,9 \times 10^5$	<10

Tab. 8 zeigt die Ergebnisse für Versuche, die auf diese Weise durchgeführt wurden. In Experiment a. und b. wurde ein am2-Extrakt und ein am5-Extrakt kombiniert, im Versuch c. ein am1-Extrakt mit einem am2-Extrakt. Als Kontrolle wurde den Extraktgemischen jeweils statt DNS das gleiche Volumen Tris-Puffer zugefügt. Als weitere Kontrolle wurde ein Teil der DNS vor Zugabe zu einem Extraktgemisch mit DNase I verdaut. Nach Inkubation lag der Titer für beide Extraktgemische (am1+am2, am2+am5) bei Zugabe intakter DNS über den Titern der Kontrollen. So erhielt man für die Kombination am2+am5 in Versuch b. mit DNS $2,7 \times 10^5$ pfu/ml auf Su70(sie) gegenüber einem Titer von $<10^1$ für die Kontrollen. Bei der Kombination am1+am2 lieferten die Kontrollen ebenfalls keine pfu auf Su70 (sie), die DNS-Zugabe dagegen $6,9 \times 10^5$ /ml. Es sind offenbar in vitro-Phagen entstanden.

Wenn exogene DNS verpackt wird, müssen die in vitro-Phagen die gleichen am-Mutationen haben, wie die zugegebene DNS, also am2 am13 sein. Das läßt sich in einer Kombination am1 am13+am5 am5 am13 prüfen, da keiner der beiden Extrakte am2-Mutanten enthält. Deshalb wurden aus einem solchen Verpackungsversuch 20 Einzelplaques von Su70(sie) mit den oben beschriebenen DB-Stämmen und

durch Komplementationstropf-Test (s. Material und Methoden) untersucht. 18 der Plaques bestanden aus am2, einer war am5 und einer Wildtyp, der vermutlich durch Rekombination mit dem Prophagen, der des Indikators entstanden ist. Das Ergebnis bestätigte also, daß tatsächlich exogene DNS verpackt worden war.

Es ist zu erwarten, daß bei Verpackung exogener DNS die Zahl der in vitro-Phagen mit der Menge der zugefügten DNS steigt. Um dies zu prüfen, wurden zu einem Extraktgemisch am1 am13+am5 am5 am13, dessen eigene DNS zerstört worden war, zunehmende Konzentrationen von DNS zugefügt (Fig. 7).

Der Plaquetiter auf Su70 (sie) steigt proportional zur DNS-Konzentration. Selbst die höchste Konzentration von 100µg scheint die Kapazität der Extrakte nicht abzusättigen, da auch dieser Wert proportional zur zugegebenen Menge liegt (a). Der Titer für 50µg liegt höher als zu erwarten, was vermutlich auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen ist. Als Kontrollen wurde DNS mit DNase verdaut (A), bzw. einer Probe kein ATP zugegeben (B). Die Plaquetiter liegen beide beim Wert ohne DNS-Zugabe.

Die Kontrollen zu den Versuchen, die in Tab. 8 und Fig. 7 zusammengestellt wurden, zeigen, daß mit diesem Versuchsansatz exogene DNS verpackt werden kann. Es bilden sich in vitro infektiöse Phagen. Es war aber anzunehmen, daß die Reaktion noch nicht optimal verläuft, da z. B. die Konzentrationen der zugegebenen Hilfsstoffe wie ATP und Spermidin, die vom Konzept von Kaiser und Masuda übernommen worden sind, nicht unbedingt auch für P22 besonders günstig sein müssen. Möglicherweise sind auch Modifikationen bei der Extrakterstellung von Vorteil. Es sollte deshalb geprüft werden, an welchen Punkten das System sich verbessern ließe.

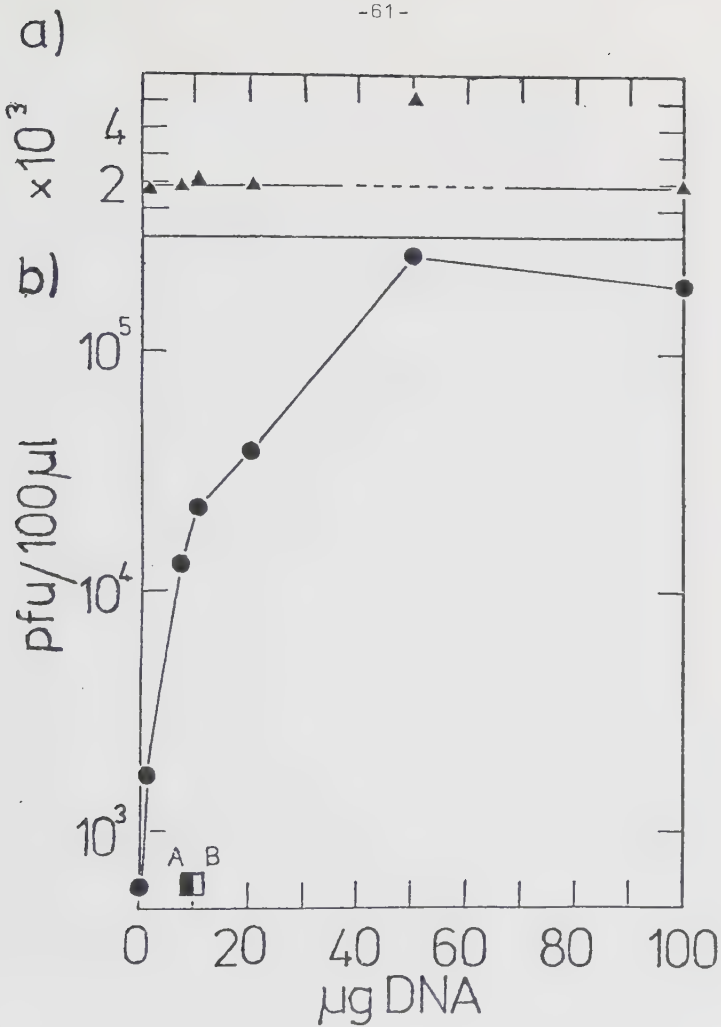


Fig.7: Verpackung exogener DNS aus 2·13·L-infizierten end⁻-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen:
Es wurde ein am1- und ein am5-Extrakt gemischt und verschiedene Konzentrationen der DNS zugegeben. Nach 3 Stunden Inkubation wurde auf Su70(sie) titriert.
a) pfu/ μg DNS, errechnet aus den Daten in b)
b) Kontrollen: A: Die DNS wurde vor Zugabe zum Extraktgemisch mit DNase I verdaut
B: Dem Verpackungssassay wurde kein ATP zugefügt

4. Zusammenfassung I

Für das Ziel, möglichst frühe Schritte der P22-Reifung, vor allem die DNS-Verpackung, in vitro zu untersuchen, war das bereits für den Phagen λ entwickelte in vitro-System, das von Botstein erfolgreich für späte Schritte der Phagen-P22-Reifung übernommen worden war, nicht geeignet. In diesem System werden zwei verschiedene Extrakte, erhalten aus am-infizierten Wildtypzellen, gemischt, wobei einer oder beide als DNS-Donor fungieren. Die Versuche zeigten, daß die Zahl der Phagen in den einzelnen Extrakten, die background-Phagen, zu hoch war, um empfindliche in vitro-Reaktionen nachzuweisen. Der background ließ sich auch nicht senken. Deshalb wurde der Ansatz geändert. Zu einer Mischung von zwei Extrakten, die gemeinsam alle Vorläuferstrukturen und Enzyme enthalten, deren DNS aber zerstört wurde, wird DNS aus end⁻-Zellen, die mit einer am2 am13 c^L IP22-Mutante infiziert waren, zugefügt und nach Zugabe von Hilfsstoffen inkubiert. Die DNS trägt die c-Immunität des Phagen L, so daß in vitro-Phagen selektiv titrierbar sind. Über lange DNS, die in vivo Vorläuferstruktur der reifen DNS ist, konnte, wie lineare Sucrose-Gradienten und Agarose-Gelelektrophorese zeigten, unter entsprechenden Bedingungen aus end⁻-Zellen, die mit am2 am13 c^L infiziert waren, gewonnen werden.

C.II. Optimierung des Verpackungsansatzes

Verschiedene Faktoren können auf das Ergebnis einer Verpackungsreaktion Einfluß haben:

- die Qualität der Extrakte, die u. a. durch die Konzentration der Vorstufen und aktiven Enzyme bestimmt wird
- die Reaktionszeit, die für die Bildung möglichst vieler in vitro-Phagen notwendig ist
- die Konzentration der für die Verpackungsreaktion notwendigen Stoffe wie ATP, Spermidin und Magnesium
- die Qualität und Konzentration der DNS, die im Verpackungsansatz eingesetzt wird.

1. Qualität der Extrakte

1.1. Inkubationszeit

Um eine möglichst hohe Extraktkonzentration zu bekommen, wurden die infizierten Zellen durch Zentrifugieren und Aufnahme des Pellets in ein kleines Volumen Puffer stark konzentriert, im allgemeinen 100- bis 300-fach. Eine stärkere Konzentrierung ist nicht möglich, da die Extrakte dann wegen der hohen Viskosität nicht mehr handhabbar sind. Zur Erhöhung der intrazellulären Anreicherung von Phagenprodukten werden, wie in I beschrieben, zur Infektion der Extraktzellen Reifungsmutanten verwendet, denen zusätzlich ein Lysisdefekt eingekreuzt wurde. Auf diese Weise ist Akkumulation der Phagenvorstufen und Enzyme möglich. Je länger die infizierten Zellen inkubiert werden, um so mehr Phagenprodukte sollten sich anreichern und um so effektiver sollte die Verpackung exogener DNS ablaufen.

Tab. 9: Einfluß der Inkubationsdauer bei der Extrakt-herstellung auf die Effizienz der Verpackung

Extrakte	Inkubations- dauer	pfu/ml auf Su70	pfu/ml auf Su70(sie)	
			-DNS	15g DNS
a. am1 am13 +am2 am13	40 Min.(30°C)	$7,0 \times 10^7$	$< 10^1$	$7,5 \times 10^2$
	70 Min.	$1,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$
b. am1 am13 +am2 am13	60 Min.(30°C)	$5,1 \times 10^8$	$< 10^1$	$6,2 \times 10^4$
	75 Min.	$6,3 \times 10^9$	$< 10^1$	$6,9 \times 10^5$
c. am1 am13 +am2 am13	30 Min.(30°C)	$6,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
	50 Min.	$2,3 \times 10^9$	$3,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
	75 Min.	$4,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$
d. am1 am13 +am5 am13	45 Min.(37°C)	$2,1 \times 10^8$	$< 10^1$	$1,5 \times 10^4$
	75 Min.	$6,2 \times 10^8$	$< 10^1$	$1,5 \times 10^5$

Ab Tab.9 sind nur noch am5 am5 am13 als am5-Mutante verwendet worden.Sie wird immer als am5 am13 bezeichnet.

Wie Tab. 9 zeigt, ist das auch der Fall. Im Versuch wurden die infizierten Zellen bei gleicher Temperatur unterschiedlich lang inkubiert und für eine in vitro Reaktion verwendet. In allen Ansätzen ließen sich durch längere Inkubation vor Extrakt Herstellung höhere Titer erzielen. Der Titer der background-Phagen auf Su70 und die Zahl der plaques, die auf Su70 (sie) erscheinen, auch wenn keine DNS zugegeben wurde, ist bei Extraktgemischen mit längerer Inkubationszeit ebenfalls höher (auf Su(sie) in den Versuchen a. und c. aus nicht bekannten Gründen höher als für spontane vir-Mutanten zu erwarten). Das stört aber die Auswertung der Versuche nicht, da die Titer der in vitro-Phagen immer um ein Vielfaches höher liegen.

Es stellte sich bei den Versuchen allerdings heraus, daß Inkubationszeiten länger als etwa 70 Minuten zur vorzeitigen Lyse der Zellen während der Aufbereitung der Extrakte führen trotz des Defekts in Gen 13. Deshalb wurden alle infizierten Kulturen zur Extrakterstellung nach Infektion 60 bis 70 Minuten inkubiert.

1.2. Inkubationstemperatur

Bei höherer Inkubationstemperatur sollten die Phagenprodukte schneller gebildet werden. Außerdem werden in einem Lysat bei höherer Temperatur zwar gefüllte Köpfe und Bodenplatten in normaler Zahl synthetisiert, es werden aber weniger ganze Phagen fertiggestellt als bei niedrigerer, da das Assembly von Kopf und Bodenplatte gestört ist (Israel 1967). So sollten auch weniger background-Phagen entstehen. Deshalb wurde im Versuch, der in Tab. 10 zusammengefaßt ist, die Inkubationszeit jeweils konstant gehalten, die Temperatur aber variiert.

Tab. 10: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Zahl der background-Phagen (Dauer der Inkubation nach Infektion jeweils 50 Min.)

Extrakte	Inkubations- temperatur	pfu/ml auf Su70	pfu/ml auf Su70 (sie)	
			-DNS	15µg DNS
am2 am13+ am5 am13	30°C	$2,2 \times 10^8$	$< 10^1$	$6,2 \times 10^2$
	37°C	$2,1 \times 10^8$	$< 10^1$	$4,8 \times 10^4$
am1 am13+ am2 am13	30°C	$7,0 \times 10^7$	$< 10^1$	$7,5 \times 10^2$
	34°C	$2,2 \times 10^8$	$< 10^1$	$4,4 \times 10^3$

In vitro Reaktionen mit Extrakten, die bei höherer Temperatur (37°C) hergestellt wurden, sind eindeutig effektiver. Gleichzeitig sind die Titer der background-Phagen auf Su70 kaum höher als die der Extrakte, die bei 30°C entstanden sind. Es ist also vorteilhaft, die infizierten Zellen bei 37°C zu inkubieren und nicht bei niedrigerer.

1.3. Konzentration der Extrakte

Es ist anzunehmen, daß die Komponenten eines der Extrakte limitierend für die Verpackungsreaktion sind. So kann z. B. in einem am2-Extrakt nur die angereicherte Zahl der proheads durch einen am5-Extrakt komplementiert werden, auch wenn in dem am5-Extrakt eine Konzentration von qp2 beigesteuert wird, die für die Bildung von mehr in vitro-Phagen reichen würde.

Um zu prüfen, inwieweit die Konzentration der einzelnen Extrakte Einfluß auf die Verpackungsergebnisse hat, wurden mit Extraktkombinationen am1+am2, am1+am5 und am2+am5 (Näheres zu den einzelnen gps und Auswertung der Reaktionen in Teil III) Versuche, in folgender Weise durchgeführt: Aliquots eines unverdünnten Partners wurden mit gleichen Volumina des anderen Partnerextrakts gemischt, dessen Konzentration durch Verdünnen mit Puffer variiert wurde. Mischungsverhältnis 1:1 bedeutet dann, daß beide Partner unverdünnt eingesetzt wurden. Die Zahl der gebildeten in vitro-Phagen in den verschiedenen Mischungsverhältnissen wurde titriert.

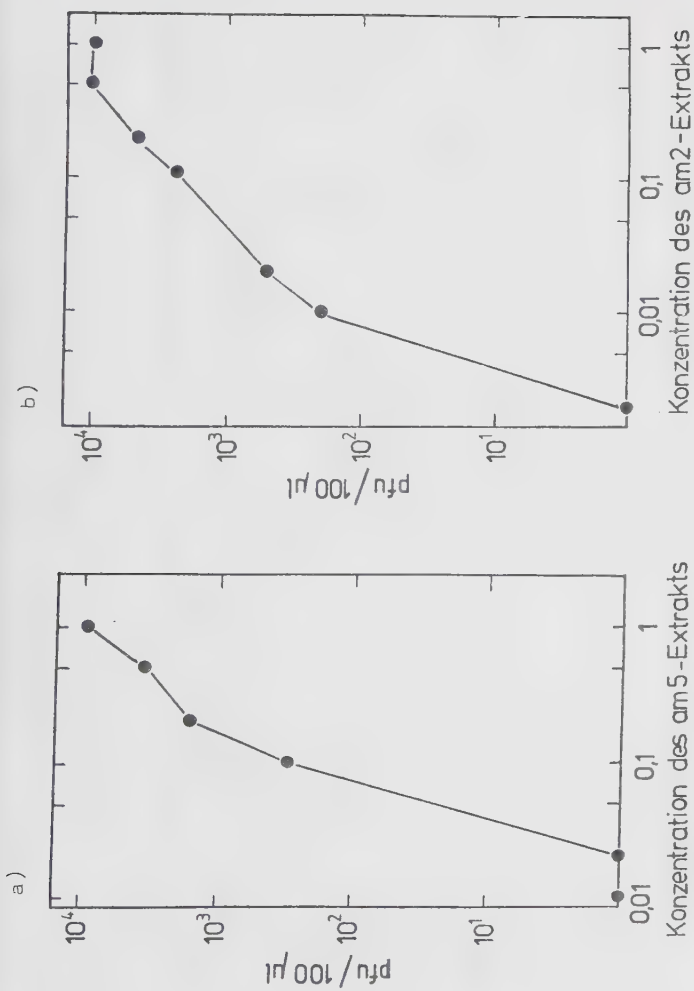


Fig.8: Verpackung exogener DNS mit unterschiedlichen Konzentrationen der Extrakte - am2 am13 + am5 am13

- a) die Konzentration des am2-Extrakts wurde konstant gehalten, die des am5-Extrakts in der angegebenen Weise mit Puffer verdünnt
- b) am5 am13-Extrakt wurde konstant gehalten, am2 am13 - Extrakt Konzentration variiert

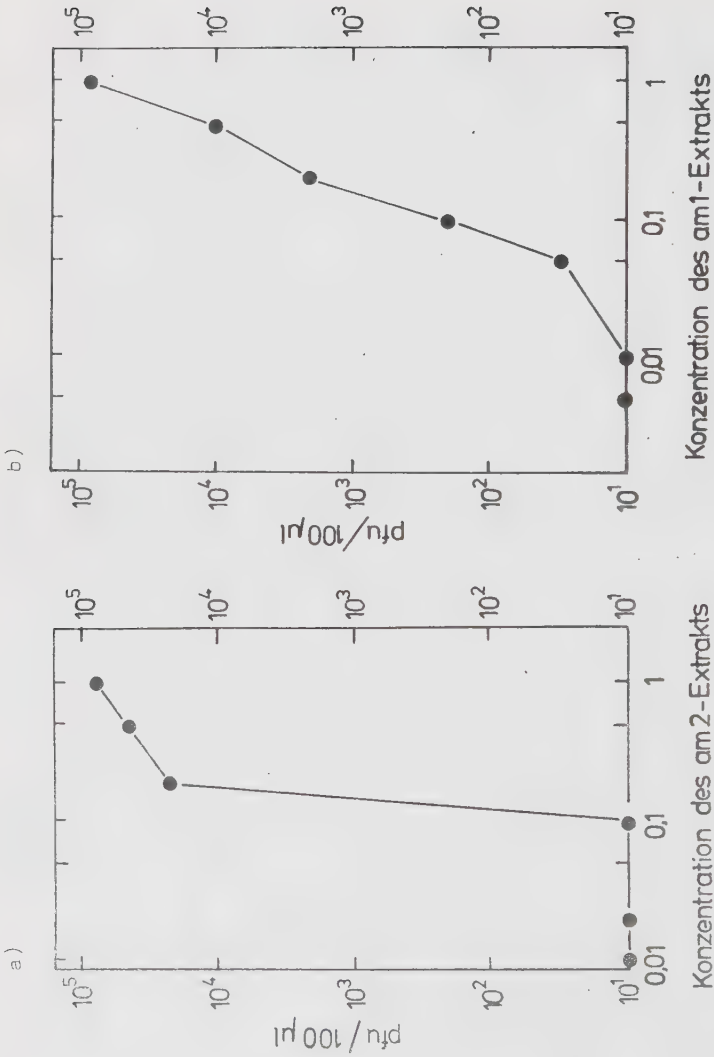


Fig. 9: Verpackung exogener DNS mit unterschiedlichen Konzentrationen der Extrakte - am1 am13 + am2 am13
a) die Konzentration des am1 am13-Extrakts wurde konstant gehalten; die des am2-Extrakts verändert
b) am2 wurde konstant gehalten, am1 variiert

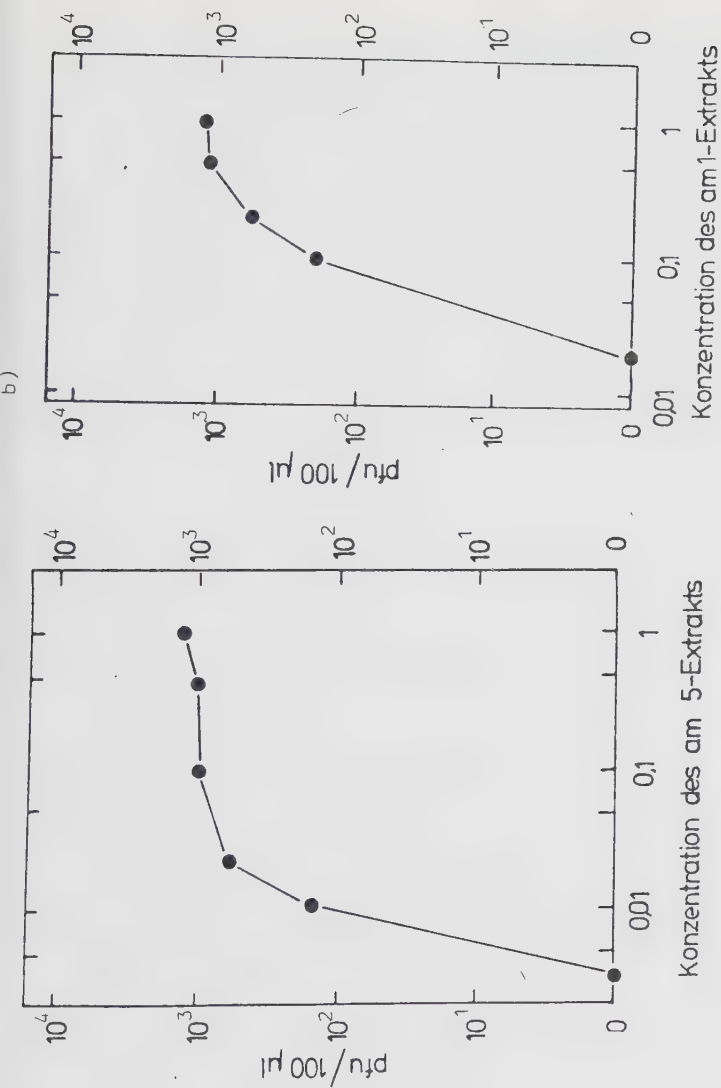


Fig.10: Verpackung exogener DNS mit unterschiedlichen Konzentrationen der Extrakte-am1 am13 + am5 am13
a) am1 hatte immer dieselbe Konzentration, am5 wurde in seiner Konzentration durch Verdünnen mit Puffer verändert
b) hier wurde die Konzentration von am1-Extrakt verändert

Die Fig. 8a (am2 konst.) zeigt einen Anstieg des Titors der in vitro-Phagen, der annähernd proportional mit der Konzentration des am5-Extrakts zunimmt. Es kam zu keiner Sättigung, d. h. daß die Menge der proheads und möglicherweise anderer Bestandteile, die der am2-Extrakt liefert, selbst mit dem unverdünnten am5-Extrakt nicht abgesättigt wird. Dieses Ergebnis wird durch Fig. 1b bestätigt. Hier wurde die Konzentration des am2-Extrakts variiert. Bereits die Hälfte des am2-Extrakts und die darin enthaltenen proheads reichen aus, um die maximale Anzahl der in vitro-Phagen zu liefern. Die Menge der proheads ist also nicht limitierend, sondern eine der Komponenten, die der am5-Extrakt beisteuert.

Fig.9: am1+am2

Da der am2-Extrakt intakte proheads enthält, Genprodukt 2(gp2) das an der DNS-Verpackung beteiligt ist, aber fehlt bzw. dieses vom am5-Extrakt geliefert wird, der dafür keine Kopfstrukturen enthält, ist denkbar, daß die Konzentration von gp2 in dieser Kombination nicht ausreicht, um alle proheads mit DNS zu füllen.

Einen ähnlichen Kurvenverlauf wie für die Kombination 2 + 5 erhielt man bei der Kombination eines am1-Extrakts mit einem am2-Extrakt. Wurde die Konzentration des am2-Extrakts konstant gehalten, die von am1 variiert, nahm die Zahl der in vitro-Phagen etwa proportional mit der Konzentration von am1 zu. Ein Plateau wurde nicht erreicht. Offenbar reicht auch die höchste Konzentration des am1-Extrakts nicht aus, um den am2-Extrakt abzusättigen.

Wurde die am2-Konzentration verändert, waren mit einer 1/10-Verdünnung des Extraktes noch keine in vitro-Phagen zu erhalten, bei doppelter Konzentration (1/5-Verdünnung) wurde etwa 2×10^4 Phagen/ml gebildet. Bei weiterer Zunahme der Menge von am2-Extrakt stieg der Titer nur noch auf den vierfachen Wert. Der Anstieg verlief also in etwa proportional. Ein Plateau war auch hier nicht zu erreichen.

Trotzdem scheint im allgemeinen bei dieser Kombination der am1-Extrakt limitierend zu sein, wofür auch andere in derselben Weise durchgeführte Versuche sprechen. In dieser Kombination werden sicher vorwiegend, wenn nicht ausschließlich nur die 2⁻-proheads mit DNS gefüllt, die 1⁻-proheads nicht (siehe CIII.2.1.)

Fig.10: am1+am5

In einer Mischung von am1 und am5 scheint der am1-Extrakt limitierend zu sein, da bei Veränderung der Konzentration des am5-Extrakts schon die 1/10-Verdünnung des am5-Extrakts ausreicht, um die maximale Zahl von in vitro-Phagen zu bilden. Variiert man dagegen den Anteil des am1-Extrakts, steigt der Titer der in vitro-Phagen proportional zur Zunahme der Extraktkonzentrationen. Die Reaktion verläuft allerdings sehr ineffektiv, was keine eindeutige Interpretation zuläßt (Näheres zu dieser Kombination in Teil III.2.1.)

1.4. Zerstörung der Extrakt-DNS

Um eine Konkurrenz der extrakteigenen DNS mit der zugegebenen DNS in einer Verpackungsreaktion zu verhindern, muß diese Extrakt-DNS zerstört werden. Bei ähnlichen Versuchen mit den Phagen λ , P2 und T1 wird das mit Hilfe von Ultraschall erreicht. Da diese Methode bei Verwendung verschiedener Extrakte wegen notwendiger Säuberung der Gerätespitze zeitraubend ist, wurde versucht, dasselbe Ergebnis zu erzielen, indem die Extrakte mehrfach in einer Spritze aufgezogen wurden, bevor sie in einer Verpackungsreaktion eingesetzt wurden.

Tab. 11: Zerstörung der Extrakt-DNS mit verschiedenen Methoden

Extrakte	Behandlung der Extrakte mit	pfu/ml auf Su70(sie) DNS-Präparation				
		-DNS	I	II	III	IV
am2 am13+	Spritze	$<10^1$	$1,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$
am5 am13	Spritze + Ultraschall (5 Sek.)	$<10^1$	$9,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	
	Ultraschall (5 Sek.)	$<10^1$	$1,6 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$	
	Ultraschall (15 Sek.)	$<10^1$	$5,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
	unbehandelt		$2,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^1$		

Tab. 11 zeigt einen Vergleich von Verpackungsversuchen, bei denen die Extrakte zu Aliquots aufgeteilt waren und jedes Aliquot unterschiedlich behandelt wurde. Es wurden verschiedene DNS-Präparationen zur Verpackung eingesetzt. Als Kontrolle diente jeweils eine Extraktmischung, der Puffer statt DNS zugegeben wurde und eine Mischung aus nicht behandelten Extrakten. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit einer Spritze zu mindestens genauso guten Ergebnissen führte, wie kurzzeitiges Beschallen. Auch längeres Beschallen (bis 60 Sek.) brachte keine besseren Ergebnisse, führte im Gegenteil mitunter zu erheblich schlechteren, vermutlich weil Phagenstrukturen in den Extrakten zerstört werden. Wurden die Extrakte weder mit der Spritze noch durch Ultraschall behandelt, waren nur sehr niedrige Titer von in vitro-Phagen zu erzielen. Es ist also notwendig die Extrakte vor einem Verpackungsversuch mit der einen oder anderen Methode zu behandeln. Genauso wie durch das Beschallen verlieren die Extrakte durch das Aufziehen in einer Spritze ihre große Viskosität und lassen sich dadurch gut handhaben.

1.5. Bakterieller Wirt für die Extrakterstellung

Um den Anteil der zelleigenen Nukleasen in den Extrakten, die die zugegebene DNS zerstören könnten, zu erniedrigen, wurden Extrakte durch Infektion des end⁻-Stammes DB 5575 statt des Wildtyps LT2 gezogen.

Tab. 12: Verwendung eines end⁻I-Wirts zur Extrakterstellung

Extrakte	Wirt	pfu/ml auf Su70	pfu/ml auf Su70(sie)	
			-DNS	15µg DNS
am1 am13+	end ⁻ I	$1,5 \times 10^9$	$4,1 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$
am2 am13	LT2	$9,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$

Tab. 12 zeigt, daß ein Vorteil nicht nachweisbar ist. Es ist allerdings zu bedenken, daß Ergebnisse verschiedener Extraktansätze - end⁻ bzw. LT2 - nicht direkt vergleichbar sind. Zumindest verhindert das Vorhandensein von Extrakt nukleasen die Verpackung von DNS nicht. Sicherheits halber werden im Standardansatz alle Extrakte durch Infektion des end⁻-Stammes hergestellt.

2. Dauer der Verpackungsreaktion

Um zu prüfen, wieviel Zeit notwendig ist, bis die Bildung aller in vitro-Phagen abgeschlossen ist, wurde die Kinetik der Phagenproduktion bestimmt. Hierzu wurden je ein am1 am13- und ein am5 am5 am13-Extrakt gemischt und nach Zugabe von DNS inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden dem Ansatz Proben entnommen und auf Su70(sie) titriert (Fig. 11).

Nach 10 Minuten Inkubation ist bereits die Hälfte der in vitro-Phagen fertiggestellt. Nach etwa 40 Minuten wird ein Plateau erreicht, was bedeutet, daß alle in vitro-Phagen, die unter diesen Bedingungen entstehen können,

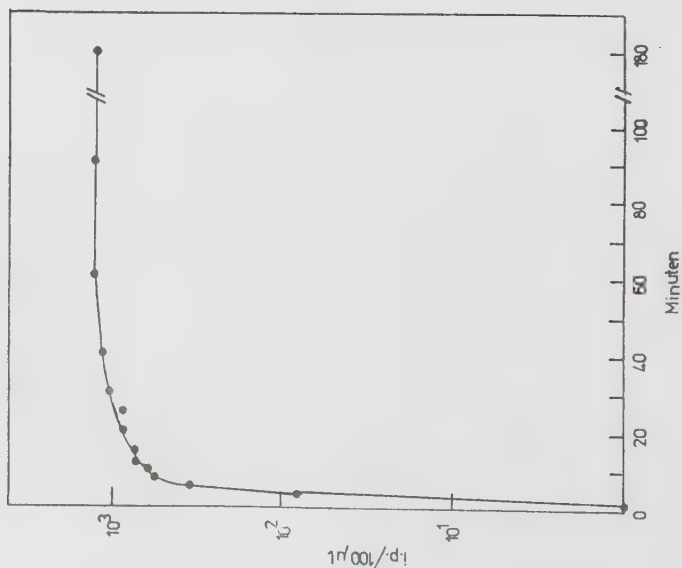


Fig. 11: Kinetik der Verpackungsreaktion: Ein am1 am13- und ein am5 am5 am13-Extrakt wurden gemischt, DNS aus am2 am13 am22-infizierten end-⁻Zellen zugefügt und bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und auf 5070(sie) plattiert.

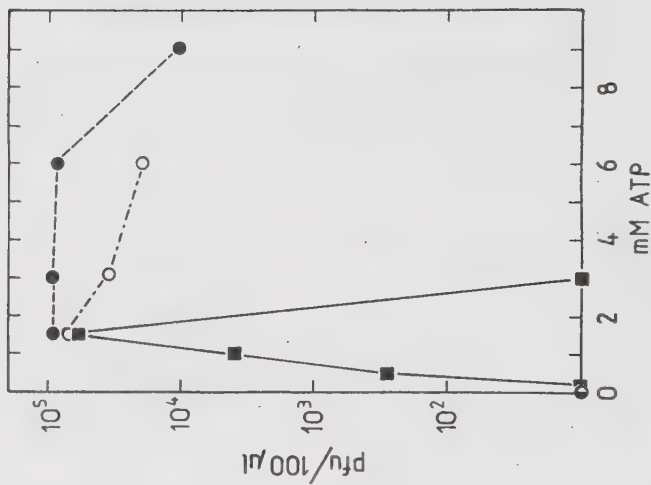


Fig. 12: Abhängigkeit der Verpackungsreaktion von ATP: Aliquots eines am2- und eines am5-Extrakts in unterschiedlichen Pufferkonzentrationen (Tris-HCl) wurden mit 2·10⁻³ L/end -DNS gemischt und ATP in den angegebenen Endkonzentrationen zugefügt.
 ■-■-■ 6mM Tris, O-O 25mM Tris, ●-●-● 100mM Tris

gebildet sind. Um in späteren Experimenten sicherzustellen, daß tatsächlich alle in vitro-Phagen fertiggestellt werden, wird in einem Standardexperiment der Verpackungsansatz mindestens 60 Minuten inkubiert.

3. Optimierung weiterer Komponenten der Verpackungsreaktion

3.1. ATP

Die DNS-Verpackungsreaktion ist ein energieabhängiger Prozess und bedarf der Zugabe von ATP wie in Fig. I.7 ersichtlich war. Um die optimale ATP-Konzentration für das entwickelte in vitro-System für P22 zu bestimmen, wurden die Versuche unter Standardbedingungen durchgeführt. Dabei wurde nur die ATP-Konzentration variiert.

Fig. 12 zeigt die Ergebnisse einer Kombination aus am2 am13- und am5 am5 am13-Extrakten. Das ATP-Optimum liegt bei 1,5mM, ist also identisch mit dem von Kaiser, Masuda für λ beschriebenen. Bereits bei der doppelten Konzentration ist das Ausfallen eines Niederschlags zu beobachten, was möglicherweise im Zusammenhang mit einem rapiden Absinken des PH-Werts durch Hydrolyse von ATP steht. Eine Verpackungsreaktion wird dadurch verhindert. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde die Konzentration des verwendeten Puffers auf 25mM bzw. auf 100mM erhöht und der Ansatz nach Zugabe von DNS und ATP in unterschiedlicher Konzentration inkubiert. Die Hemmung der Reaktion durch Hydrolyse des ATP ist damit unterbunden. Trotzdem war bei Erhöhung der ATP-Konzentration über 1,5mM keine Zunahme der Produktion von in vitro-Phagen zu beobachten. Bei 1,5mM liegt also das Optimum. Alle folgenden Versuche wurden in 25mM Puffer mit 1,5mM ATP durchgeführt.

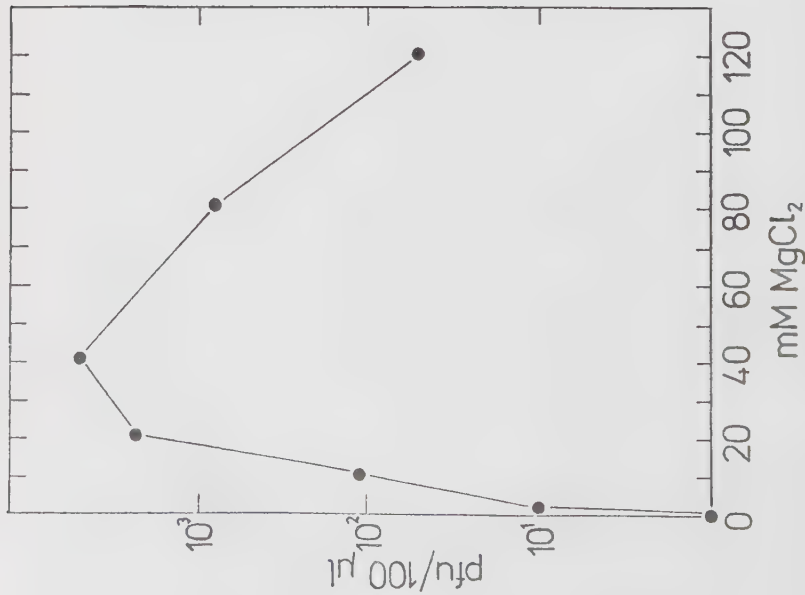


Fig.13: Abhängigkeit der Verpackungsreaktion von der Magnesiumkonzentration:
In einer Mischung eines am13- und eines am5 am13-Extrakts mit 2.13-L/end -ONS wurden die angegebenen Konzentrationen (Endkonzentrationen) von MgCl₂ eingesetzt.

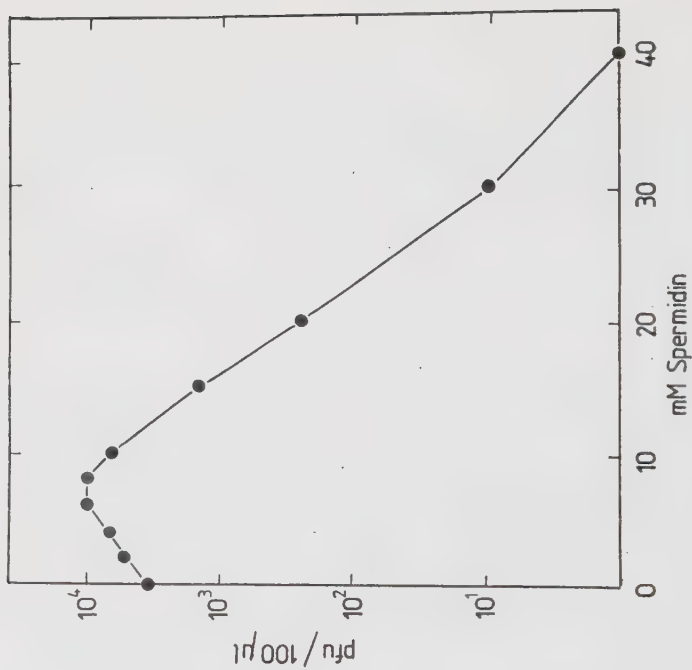


Fig.14: Einfluß von Spermidin:
In Verpackungsassays aus einem am2 am13-Extrakt und einem am5 am5 am13-Extrakt mit 2.13-L/end -ONS wurde Spermidin in den angegebenen Endkonzentrationen zugefügt. Inkubiert wurde 90 Minuten bei 34 °C.

3.2. Mg-Ionen

Da Nukleaseaktivität für die Verpackung von P22-DNS in die proheads erforderlich ist, ist es möglich, daß Mg-Ionen als Ko-faktor eine Rolle spielen, wie das für λ bekannt ist (Kaiser, Masuda 1973). Um für diese die optimale Konzentration zu ermitteln, wurde in einer Mischung von am1 und am5-Extrakten die Verpackungseffizienz bei Zugabe zunehmender Konzentrationen von Mg-Ionen bestimmt.

Fig. 13 zeigt, daß Verpackung in einem breiten Mg-Konzentrationsbereich möglich ist. Die meisten in vitro-Phagen erhält man aber bei einer Konzentration von 40mM. Das Optimum liegt bei einem Wert, der 20mal so hoch ist, wie der für λ beschrieben wurde (Kaiser, Masuda 1973). Ein Kontrollexperiment, in dem kein Mg zugegeben wurde, jedoch EDTA, um alle noch im Extrakt vorhandenen Mg-Ionen zu binden, zeigt die absolute Notwendigkeit von Mg für die Verpackungsreaktion. Es werden bei Fehlen zweiwertiger Ionen bzw. Mg-Ionen keine in vitro-Phagen gebildet. Im Standardexperiment werden Mg^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 40mM eingesetzt.

3.3. Polyamine

Polyamine spielen eine wichtige Rolle bei der Kondensation der DNS bei der Phagenreifung (Cohen, McCormick 1979). Deshalb ist Spermidin ein wichtiges Reagenz in einem Verpackungssystem wie dem von Kaiser und Masuda. Um die Konzentration von Spermidin für die Verpackung von P22-DNS zu optimieren, wurde einem am2 am5-Extraktgemisch Spermidin in einer Konzentration von 0 bis 40mM zugegeben (Fig. 14). Genauso wie im Kaiser-Masuda-System ist eine Konzentration von 6mM optimal. Gibt man kein Spermidin zum Reaktionsgemisch, erhält man dennoch in vitro-Phagen, da die Extrakte selbst eine gewisse Menge von Polyaminen liefern.

Es wurde außerdem geprüft, ob neben dem Spermidin die Zugabe eines weiteren Polyamins, Putrescin, vorteilhaft ist. Es wird verschiedentlich in Experimenten mit λ verwendet (Hohn et al. 1975; Hohn, Murray 1977). Tab. 13 zeigt, daß dies offenbar nicht der Fall ist. Man erhält die gleiche Ausbeute an in vitro-Phagen, wenn man dem Gemisch nur Spermidin zufügt oder aber Spermidin und Putrescin.

Tab. 13: Kein Einfluß von Putrescin auf die Effizienz der Verpackung

Extrakte		pfu auf Su70 (sie) DNS-Präparationen	
		DNS I	DNS II
am2 am13	Spermidin	$6,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
+am5 am13			
	Spermidin+		
	Putrescin	$6,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$

3.4. Qualität der DNS-Präparation

Nicht nur eine Komponente der Extrakte kann limitierend für die in vitro-Reaktion sein, auch die Konzentration verpackbarer DNS reicht möglicherweise nicht aus, um eine effektive Reaktion einzuleiten, was sich schon in Fig. 7 zeigte. Die zugegebene maximale Konzentration reichte nicht aus, um die Verpackungsaktivität der Extrakte abzusättigen. Das Verpackungsergebnis hängt also auch von der Qualität der DNS-Präparation ab. Wie unter I.3 beschrieben, muß sehr schonend vorgegangen werden, um taugliche Präparate zu erhalten.

Tab. 14: Verpackung von DNS aus verschiedenen Präparationen

Extrakte		pfu/ml auf Su70(sie)					
		DNS I	DNS II	DNS III	DNS IV	DNS V	DNS VI
am1	am13	$8,0 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
+am2	am13						

Tab. 14 faßt Ergebnisse von Verpackungsversuchen zusammen, in denen einem Gemisch aus am1 und am2-Extrakten DNS aus verschiedenen Präparationen zugegeben wurde. Die Ausbeute an in vitro-Phagen variiert zwischen 8×10^3 und 1×10^6 .

Mit "guter" DNS ist also ein 100fach höherer Wert zu erzielen als mit "schlechter" DNS.

In einem weiteren Versuch wurden zu am2+am5-Extraktgemischen, die aus verschiedenen Extraktpräparationen stammten, DNS aus unterschiedlichen DNS-Präparationen zugefügt (Tab. 15).

Tab. 15: Verpackung von DNS aus verschiedenen Präparationen mit verschiedenen Extraktpräparationen

Extrakte		pfu/ml auf Su70(sie)			
		DNS I	DNS II	DNS III	DNS IV
a.					
am2	am13+	$3,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
am5	am13				
b.					
am2	am13+	$3,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$
am5	am13				

Die Werte machen deutlich, daß die Extraktmischung am2 a. mit am5 a. schlechter verpackt als am2 b. mit am5 b.. Außerdem ist zu erkennen, daß die "guten" b. Extrakte auch "schlechte" DNS besser verpacken, als die schlechten Extrakte. Es besteht eine Wechselwirkung zwischen Extrakt- und DNS-Qualitäten. die nicht einfach damit zu

erklären ist, daß eine der Komponenten der "schlechten" Extrakte limitierend ist, sonst müßte "schlechte" DNS (I), die mit "guten" Extrakten b. immerhin zu etwa $3,2 \times 10^5$ in vitro-Phagen führen, mit den "schlechten" Extrakten a. mindestens den Wert von $1,5 \times 10^5$ in vitro-Phagen erreichen, da die Extraktkomponenten dafür offenbar ausreichen ($1,5 \times 10^5$, DNSIV).

3.5. Begrenzte Vergleichbarkeit der absoluten Ergebnisse

Es ist zwar möglich, ein solches in vitro-Verpackungssystem zu optimieren, aber selbst unter den hierdurch festgelegten Standardbedingungen für Extrakterstellung, DNS-Präparation und Reaktionsansatz variiert die Qualität der Extrakte und der DNS in jeder Präparation und dadurch die Ergebnisse verschiedener Verpackungsansätze noch ziemlich stark, wie Tab. 14 und 15 zeigen. Es spielen offenbar Faktoren eine Rolle, die nicht exakt einzuhalten sind bzw. unbekannt sind. Will man also mehrere Versuche in der Auswertung in Beziehung zueinander setzen ist es notwendig, alle in einem Versuchsansatz durchzuführen. Es wurden alle Verpackungsversuche außerdem mit anderen Extraktpräparationen und DNS-Präparationen wiederholt, um mögliche Verfälschung durch zu geringe Aktivität von Extrakten und DNS zu erkennen. Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden vorwiegend mit 2 DNS-Präparationen durchgeführt, um zumindest eine ungefähre Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten. Bei der Verwendung von Extrakten war es nicht möglich, sich auf eine kleine Zahl zu beschränken, da die Extrakte nur etwa 2 Monate haltbar sind, später an Aktivität verlieren. Im Verlauf der Arbeit mußten immer wieder neue Extrakte präpariert und eingesetzt werden.

Mit Hilfe dieses für P22 entwickelten und optimierten in vitro-Verpackungssystems lassen sich gezielt einzelne

Schritte der Phagenreifung untersuchen, die Funktionen der einzelnen Gene näher bestimmen und Fragen klären, die den Ablauf der DNS-Verpackung und die Form der zu verpackenden DNS betreffen.

4. Zusammenfassung

Für das Verpackungssystem, dessen Entwicklung unter I beschrieben wurde, wurden die Optima für ATP (1,5mM), Mg-Ionen (40mM, ein Wert, der 20mal so groß ist wie der für λ) und Polyamine (Spermidin 6mM) festgestellt und die Bedingungen der Extrakterstellung verbessert. Außerdem wurde die Kinetik der in vitro-Phagen-Produktion bestimmt. Nach 10 Minuten ist die Hälfte der erzielbaren in vitro-Phagen fertiggestellt, nach etwa 40 Minuten wird ein Plateau erreicht. In den Versuchen zeigte sich, daß die Ergebnisse sowohl von der Güte der Extrakte als auch der Qualität der DNS abhängen. Ergebnisse verschiedener Versuchsansätze sind untereinander nur bedingt vergleichbar.

C.III. Untersuchungen zu Funktionen der Gene, die an der Reifung des Phagen P22 beteiligt sind

Wie in der Einleitung ausgeführt, besteht die Reifung des Phagen P22 aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Es sind mindestens 12 Genprodukte beteiligt. Ihre Molekulargewichte sind bekannt. Ihre Funktionen im Reifungsprozess sind ebenfalls z. T. geklärt. Dafür machte man sich zunutze, daß bei Fehlen eines der Genprodukte das Assembly an der Stufe stoppt, an der das fehlende Genprodukt benötigt wird. So konnten durch Infektion nicht-permissiver Zellen mit verschiedenen am-Mutanten die Reihenfolge und die Reifungszwischenstufen in etwa aufgeklärt werden. Ob bakterielle Produkte ebenfalls an der Reifung des Phagen P22 beteiligt sind, weiß man bisher nicht.

Der Reifungsprozess läßt sich in drei unabhängig voneinander verlaufende Synthesewege gliedern (zusammengefaßt in Fig. 3).

- Die Proheads werden aus Hauptkopfprotein gp5, core-Protein gp8, und weiteren Genprodukten: 1, 7, 16, 20, die in geringer Molekülzahl enthalten sind, aufgebaut.
- In diese Proheads wird mit Hilfe von gp2 und gp3 unter Verlust des gp8 die parallel zur Bildung des prohead synthetisierte Überlange DNS verpackt und zu Genomlänge geschnitten. Der Kopf erhält dabei die endgültige Größe und Form. In diesem Stadium kann der gefüllte prohead die DNS noch verlieren. Gp10, gp26 und gp4 stabilisieren die gefüllten Köpfe.
- Vervollständigt wird der Phage durch Anheftung der Bodenplatte aus gp9 in einer self-assembly-Reaktion. (Botstein, Waddell, King 1973; King, Lenk, Botstein 1973; Poteete, King 1977; Earnshaw, King 1978)

1. gp10, 16, 20, und 26

In vitro-Untersuchungen der P22-Morphogenese wurden bereits von Botstein (Botstein, Waddell, King 1973) mit am-Mutanten in Gen 10, 16, 20 und 26 durchgeführt. Mutanten in Gen 10 und 26 bilden zwar vollständige DNS-gefüllte Köpfe, diese verlieren aber ihre DNS leicht wieder, wobei, wie elektronenmikroskopisch gezeigt werden konnte, leere Köpfe entstehen, die den gefüllten in Größe und Form gleichen. Mutanten in den Genen 16 und 20 synthetisieren völlig normal aussehende Phagenpartikel, die ihre DNS aber nach Adsorption an eine Wirtszelle nicht injizieren können bzw. keine Phagenfunktionen exprimieren können. Botsteins Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Es wurden am5-Extrakte, die keine Kopfstrukturen enthalten, mit Extrakten der am-Mutanten der gesamten Gengruppe gemischt und nach Inkubation auf Su70 titriert. Da in den Experimenten mit 10⁻- und 26⁻-Extrakt eine Stabilisierung DNS-gefüllter Köpfe erfolgen sollte, im 16⁻ und im 20⁻-Extrakt die Köpfe zur Infektionsfähigkeit vervollständigt werden sollten, wurde in diesen Versuchen keine exogene DNS zu den Gemischen zugegeben. Bei erfolgreicher in vitro-Reaktion waren nur in vitro-Phagen zu erwarten, die den Genotyp dieser Mutanten, also am10, am16, am20 bzw. am26, hatten. Daher ist nur deren Anzahl bei der Beurteilung der Versuche von Bedeutung. Die Tabelle 16a zeigt, daß es möglich ist am10- und am26-Extrakte mit einem am5-Extrakt zu komplementieren. Der Titer der Gemische liegt jeweils etwa 10x über dem Wert der background-Phagen der einzelnen Extrakte. Außerdem wurde der Genotyp von Einzelplaques aus den Gemischen geprüft. Sie waren vorwiegend am10 bzw. am26. Es ist also möglich die Stabilisierung der gefüllten Köpfe in vitro zu erreichen. Eine Komplementierung von am16- und am20-Extrakten mit Hilfe eines am5-Extrakts in vitro konnte dagegen

Tab. 16: Komplementationsversuche zu den Genprodukten 10, 16, 26 und 20

a.

Extrakte	pfu/ml auf Su70	
am5	$1,5 \times 10^9$	
am10	$4,0 \times 10^7$	
am5+am10	$3,0 \times 10^8$	(Genotyp am5)
	$3,2 \times 10^9$	(Genotyp am10)
am5 am13	$3,5 \times 10^9$	
am10	$2,4 \times 10^8$	
am5 am13	$3,0 \times 10^9$	(Genotyp am5)
+am10	$1,3 \times 10^{10}$	(Genotyp am10)
am5 am5	$1,7 \times 10^8$	
am26	$3,0 \times 10^8$	
am5 am5	$2,0 \times 10^9$	(Genotyp am26)
+am26		
am5 am13	$3,5 \times 10^{10}$	
am26	$3,0 \times 10^8$	
am5 am13	$3,1 \times 10^9$	(Genotyp am5)
+am26	$6,2 \times 10^9$	(Genotyp am26)

b.

am5 am13	$3,3 \times 10^9$	
am16	$3,1 \times 10^8$	
am5 am13	$1,0 \times 10^9$	(Genotyp am5)
+am16	$1,0 \times 10^8$	(Genotyp am16)
am5 am13	$5,2 \times 10^9$	
am20	$1,3 \times 10^9$	
am5 am13	$3,7 \times 10^9$	
+am20		

unter diesen Bedingungen nicht festgestellt werden. Die Titer der Gemische liegen nicht über denen der einzelnen Extrakte (Tab. 16b). Außerdem wurde der Genotyp von 90% aller Plaques, die aus der Titration eines Gemisches aus am5 und am16 stammten, als am5 bestimmt. Auch Botstein hatte in seinen Versuchen keine in vitro-Reifung von 16⁻- und 20⁻-Phagenköpfen nachweisen können. Diese beiden Genprodukte 16 und 20 müssen offenbar sehr früh in den Kopf eingebaut werden. Nachträglich ist das nicht möglich.

2. DNS-Verpackungs-Mutanten

Mutanten in den Genen 1, 2, 3, 5 und 8 sind nicht fähig, die überlange Vorstufe der reifen DNS zu Phagengenomlänge zu schneiden. Sie bleibt als Konkatermer erhalten. Die Mutanten in den Genen 1, 2 und 3 bilden aber proheads, wobei die proheads, die bei Infektionen mit am-Mutanten in den Genen 2 und 3 entstehen, alle Proteine enthalten; am1-Infektionen führen dagegen zu unvollständigen proheads ohne gp1.

2.1. Versuche zu gp1

Mischt man Extrakte von am1- und am2-infizierten Zellen, nachdem deren DNS zerstört wurde und gibt gereinigte DNS-Konkatemere aus einer 2.13.L-Infektion hinzu, zeigt Titration auf Su70(sie), daß in vitro reife Phagen gebildet wurden, d. h. daß in vitro DNS-Konkatemere geschnitten und verpackt worden sein müssen (Tab. 17a). Beide Partner liefern in dieser Extraktkombination proheads. Welche von diesen mit DNS gefüllt wurden, die vollständigen aus dem am2-Extrakt oder die defekten des am1-Extrakts oder beide, ist nicht zu entscheiden.

Tab. 17: Verpackungsexperimente zur Untersuchung von Genprodukt 1

Extrakte	pfu/ml auf Su70(sie)	
	- DNS	+DNS
a.		
am2 am13		$2,0 \times 10^5$
+am1 am13		
am5 am13		$6,0 \times 10^3$
+am1 am13		
am8 am13		$< 10^1$
+am1 am13		
am1 am13		$< 10^1$
am5 am13		$< 10^1$
am8 am13		$< 10^1$
am2 am13		$< 10^1$
b.		
am5 am13		$1,7 \times 10^4$
+am1 am13		
am1 am13		$< 10^1$
c.		
am2 am13	$< 10^1$	$2,4 \times 10^5$
+am1 am13		
am5 am13	$< 10^1$	$4,2 \times 10^3$
+am1 am13		
am8 am13	$< 10^1$	$2,3 \times 10^3$
+am1 am13		
am1 am13	$< 10^1$	$2,0 \times 10^3$
am5 am13	$< 10^1$	$< 10^1$
am8 am13	$< 10^1$	$< 10^1$

In einer Kombination eines am1- und eines am5-Extraktes liefert nur der erstere proheads, denen aber das gp1 fehlt. Intakte proheads sollte also keiner der beiden Extrakte enthalten. Die Werte in Tab. 17a und b zeigen, daß offenbar auch in so einem Gemisch zugegebene P22-DNS verpackt wurde und die Reifung der Phagen in vitro stattfand, wenn auch sehr viel seltener als in einem am1+am2-Gemisch. Eine Kombination aus einem am1- und einem am8-Extrakt jedoch, in dem wie in am5-Extrakten keinerlei Kopfstrukturen enthalten sind, lieferte keine in vitro-Phagen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie die in vitro-Phagen aus am1+am5 entstanden sind:

- in den am-Extrakten werden vermutlich durch Translationsfehler reife Phagen, die background-Phagen, gebildet (siehe I.2.). Es entstehen also trotz einer am1-Infektion gp1-haltige proheads. Werden nicht alle zu reifen Phagen fertiggestellt, bleiben gp1-haltige proheads übrig und können in vitro die zugegebene DNS verpacken.
- die am1-proheads enthalten gp1-Fragmente. In einigen Fällen können auch solche proheads DNS verpacken.
- gp1 wird vom am5-Extrakt geliefert und in die gp1-losten proheads des am1-Extrakts nachträglich eingebaut, wo es seine Funktion bei der DNS-Verpackung ausüben kann.
- die am1-proheads enthalten gp1-Fragmente. Diese werden durch intaktes gp1 ersetzt.

Sowohl das Vorhandensein vollständiger proheads als auch die Fähigkeit einiger am1-proheads, DNS zu verpacken, sollte dazu führen, daß am1-Extrakte allein DNS verpacken können. Um dies festzustellen, wurde der am1-Extrakt mit DNS gemischt, ohne daß ein anderer Extrakt zugegeben wurde. Tab. 17a und b zeigen, daß unter diesen Bedingungen keine in vitro-Phagen gebildet werden.

Dasselbe Ergebnis war zu erhalten, als einem am1-Extrakt zunehmende Konzentrationen von am5-Extrakt zugefügt wurde (Fig. 10): der am1-Extrakt allein verpackte nicht; mischte man mit am5-Extrakt, waren in vitro-Phagen nachweisbar. Mit Zunahme der Konzentration des zugegebenen am5-Extrakts bei konstanter Konzentration des am1-Partners stieg die Zahl der in vitro-Phagen bis zu einem Sättigungswert, der bei der halben Höchstkonzentration von am5 erreicht war.

Dieses Ergebnis würde den ersten beiden Hypothesen - Verpackung von DNS in gp1-haltige proheads bzw. in proheads, die gp1-Fragmente enthalten - widersprechen. Es würde die Annahme stützen, daß tatsächlich Komplementation der gp1-proheads erfolgt.

Daß diese Aussage nicht absolut zu nehmen ist, zeigen Versuche, die mit anderen Extraktpräparationen durchgeführt wurden. Ein Beispiel hierfür zeigt Tab. 17c. Es wurde jeweils wieder ein am1-Extrakt mit einem am2-, am5- oder am8-Extrakt kombiniert, wie unter Tab. 17a. Außerdem wurde geprüft, ob die einzelnen Extrakte DNS verpacken können. In diesem Versuch war auch mit einem am1-Extrakt allein Verpackungsaktivität festzustellen bzw. die Bildung von in vitro-Phagen nachzuweisen. Der Titer der in vitro-Phagen im Gemisch am1+am5 gleicht dem Wert für am1-Extrakt allein. Dasselbe Ergebnis bringt eine Kombination am1+am8.

Es ist also folgendes festzuhalten: zumindest einige am1-Extrakte enthalten proheads, die DNS verpacken können. Es ist nicht zu entscheiden, ob diese proheads gp1 in intakter Form eingebaut haben oder aber gp1-lose proheads oder proheads mit defektem gp1 (Fragment) in seltenen Fällen doch DNS verpacken können.

Tab. 17a und b und Fig. 10 machen es aber auch wahrscheinlich, daß unvollständige bzw. defekte 1-proheads durch

die Aktion des am5-Extrakts zu vollständigen 1-haltigen proheads ergänzt werden und so DNS verpacken können.

Weitere Untersuchungen zur Funktion von gp1 und den 1⁻-proheads werden von Kreutinger in derselben Arbeitsgruppe durchgeführt. So gilt es z. B. zu klären, ob 1⁻-proheads Fragmente des gp1 enthalten und ob gp1 in gereinigter Form, zugegeben zu 1⁻-proheads bzw. Extrakten, Verpackung von DNS einleiten kann.

2.2. Versuche zu gp2

Am2-Mutanten produzieren vollständige proheads, können aber keine DNS verpacken und schneiden.

Tab. 18: Verpackungsexperimente zur Untersuchung von Genprodukt 2

Extrakte	pfu/ml auf Su70(sie)	
	Exp. I	Exp. II
a.		
am1 am13 +am2 am13	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
am3+ am2 am13	$3,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
am5 am13 +am2 am13	$4,1 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$
am8 am13 +am2 am13	$6,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
b.		
2 ⁻ -proheads+ am1 am13	$9,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
2 ⁻ -proheads	$< 10^1$	$< 10^1$
2 ⁻ -proheads+ am2 am13	$< 10^1$	$< 10^1$

Tab. 18a zeigt Versuche mit am2-Extrakten in Kombination mit verschiedenen anderen Extrakten. Am2-Extrakte lassen sich mit allen geprüften Partner-Extrakten sehr gut komplementieren. Am1- und am3-Extrakte enthalten selber proheads, am3, genauso wie am2, intakte, so daß nicht zu entscheiden ist, welche der proheads mit DNS gefüllt werden. Aus den Ergebnissen für gp1 ist zu schließen, daß in einer Kombination am1+am2 vor allem oder nur 2⁻-proheads verpacken. Dies wird gestützt durch den Befund, daß auch in Kombination mit Extrakten, die keine Kopfstrukturen enthalten, wie am5 und am8, genauso viele in vitro-Phagen gebildet werden.

Die Vorstellungen, die über gp2 aus in vivo Experimenten gewonnen wurden, besagen, daß es nicht an der Bildung aktiver proheads beteiligt ist, für die DNS-Verpackung aber unerläßlich ist. Um zu prüfen, ob proheads, die während ihrer Entstehung nicht mit gp2 in Berührung kamen, verpacken können, wurden solche 2⁻-proheads aus einem 2⁻-Extrakt über CsCl- und Sucrosegradienten isoliert und gereinigt. Diese wurden dann mit einem am1-Extrakt und DNS gemischt. Wie Tab. 18b zeigt, verpacken solche 2⁻-proheads recht gut. Es scheint also für die Bildung verpackungsaktiver proheads kein gp2 benötigt zu werden. Für die weiteren Schritte der Phagenreifung vermutlich die DNS-Verpackung und das Schneiden der DNS ist gp2 aber erforderlich, da 2⁻-proheads nur bei Zugabe eines 2⁺-Extrakts verpacken, nicht aber bei Zugabe eines 2⁻-Extrakts (Tab. 18b).

Ein weiterer Schluß kann aus diesem Versuch gezogen werden. Da 2⁻-proheads, also vollständige gp1-haltige proheads, mit Hilfe eines 1⁻-Extrakts DNS verpacken können, bedeutet das, daß gp1 in den Verpackungsprozess nicht als freies Protein eingreift. Es ist offenbar ausschlaggebend, daß es sich im Kopf befindet. Was für eine Funktion es dann ausübt, ob nur eine strukturelle oder noch eine enzymatische, ist unbekannt.

2.3. Versuche zu gp3

Wie oben angesprochen, bilden am3-Mutanten (wie auch am2) vollständige proheads, die DNS wird jedoch nicht verpackt und geschnitten. Auch diese proheads lassen sich durch Zugabe von DNS und anderen Extrakten in vitro zu reifen Phagen umwandeln (Tab. 19a). Am2-Extrakte alleine verpacken nicht.

Tab. 19: Verpackungsexperimente zur Untersuchung von Genprodukt 3

Extrakte	pfu/ml auf Su70(sie)				
	DNS I	DNS II	DNS III	DNS IV	-DNS
a.					
am3+ am1 am13	$3,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$< 10^1$
am3+ am2 am13	$7,0 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	$< 10^1$
am3+ am5 am13	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$		$< 10^1$
am3+ am8 am13	$3,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$		$< 10^1$
b.					
am1 am13+ 2 ⁻ -proheads	$7,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$		$< 10^1$
am1 am13+ 3 ⁻ -proheads	$1,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$		$< 10^1$
am3+ 3 ⁻ -proheads	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$		
am3+ 2 ⁻ -proheads	$< 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$		$< 10^1$

Konzentration der proheads: 2⁻-proheads 14µg/ml
 3⁻-proheads 1,5µg/ml

Es ist aber ein deutlicher Unterschied festzustellen, ob der am3-Extrakt mit einem am2-Extrakt gemischt wird, oder mit einem anderen. Am2+am3 zeigen eine erheblich höhere Aktivität als am1+am3 oder gar am5+am3 und am8+am3. Diese Extrakte, die sowohl für den Versuch in Tab.18 als auch im Versuch von Tab. 19 verwendet wurden, lieferten mit am2-Extrakten gute Resultate, d. h. sie steuerten im Gemisch genügend gp2 bei, um effektive Verpackung zu gewährleisten.

Für die niedrige Verpackungsaktivität der am3-Extrakte mit am1-, am5- und am8-Extrakten kann es verschiedene Gründe geben. Möglicherweise liefern am1-, am5- und am8-Extrakte nicht in ausreichendem Maße gp3 in aktiver Form. Ein Hinweis darauf, daß nicht eine Komponente aus dem am3-Extrakt limitierend ist, ist, daß der am3-Extrakt mit einem am1-Extrakt bis zu 40 Mal so viele in vitro-Phagen liefert wie mit einem am5-Extrakt (Tab. 19a, DNS I). Für eine Kombination mit am8-Extrakt ist der Unterschied nicht ganz so groß (10x bei DNS I, 3x bei DNS III). Trotzdem ist aber nicht auszuschließen, daß die Anzahl der proheads im am3-Extrakt nicht ausreicht. Da in diesen Experimenten keine am3 am13 sondern eine am3-Mutante verwendet wurde, durfte bei der Herstellung der Extrakte nur 20 Minuten statt 60 Minuten inkubiert werden, um Lyse der Zellen zu verhindern. Es sind also vermutlich weniger proheads im 3⁻-Extrakt enthalten als in einem am2 am13-Extrakt. Das war auch festzustellen als ich 3⁻-proheads aus einem am3-Extrakt isolierte. Ich erhielt etwa ein Zehntel der prohead-Konzentration, die ich aus einem gleichem Volumen am2-Extrakt gewann. (Proteinkonzentration wurde nach Sedmak gemessen). Wurde solchen gereinigten 2⁻- und 3⁻-proheads ein am1-Extrakt zugefügt und die Bildung von in vitro-Phagen geprüft, ergab sich allerdings folgendes: die 3⁻-proheads verpackten, bezogen auf die eingesetzte

Menge, bis sechsmal so gut wie die 2⁻-proheads (Tab. 19b). Daß dieses Phänomen nicht zufällig nur für diese Prohead-präparation zutrifft, wird dadurch bestätigt, daß auch Poteete (Poteete, Janvik, Botstein 1979) feststellte, daß 3⁻-proheads eine 10fache Menge an in vitro-Phagen produzieren als dieselbe Menge 2⁻-proheads. Die geringere Konzentration der 3⁻-proheads in den am3-Extrakten in meinen Versuchen sollte also zumindest weitgehend durch die größere Verpackungsaktivität ausgeglichen sein. Die Zahl von aktiven proheads ist also wahrscheinlich nicht der einzige Grund für die großen Unterschiede in der Verpackungshäufigkeit eines am3-Extrakts mit einem am2-Extrakt gegenüber der mit am1-, am5- und am8-Extrakten.

Wie bereits erwähnt, verpacken gereinigte 3⁻-proheads ebenso wie gereinigte 2⁻-proheads DNS, wenn sie mit einem am1-Extrakt ergänzt werden. Zur Bildung aktiver proheads ist gp3 also offenbar nicht notwendig. Tab. 19b Eine Kombination von einem 3⁻-Extrakt mit 3⁻-proheads läßt keine in vitro-Phagen entstehen. Für die Schritte der DNS-Reifung und Verpackung ist gp3 demnach unerlässlich.

Daß das Fehlen von gp3 die DNS-Verpackung verhindert, zeigt ein weiterer Versuch. Es wurden 2⁻-proheads mit am3-Extrakt gemischt (Tab. 19b). Bei dieser Kombination sind sowohl 3⁻- als auch 2⁻-proheads vorhanden. Am3-Extrakt enthält gp2. Gp3 könnte in den 2⁻-proheads sitzen. Wenn das der Fall wäre, sollte Verpackung möglich sein. Es werden aber keine in vitro-Phagen gebildet, d. h. daß 2⁻-proheads kein aktives gp3 enthalten und daß gp3 notwendig für erfolgreiche Reifung der Phagen ist.

Zu welchem Zeitpunkt bzw. bei welchem Schritt der Phagenreifung bzw. der DNS-Verpackung gp3 gebraucht wird, ist nicht bekannt. Es könnte vorübergehend in den proheads

gebunden sein und dort seine Funktion ausüben, es könnte auch eine Bindung mit der DNS eingehen und als DNS-gp3-Komplex den prohead binden und so die Verpackung einleiten. Denkbar ist auch, daß gp3 irgendeine andere Funktion hat, z. B. die DNS für die Verpackung vorzubereiten, indem es z. B. als Nuklease Einzelstrangbrüche setzt oder sie in irgendeiner Weise modifiziert. Diese Überlegung legen Versuche von Poteete nahe, in denen er 3^- -DNS-Donor-Extrakte nicht komplementieren konnte (Poteete, Botstein 1979). In den bisher beschriebenen Versuchen war DNS aus $2 \cdot 13 \cdot L$ - Infektionen verpackt worden, also DNS, deren Synthese in Gegenwart von gp3 erfolgte. Um die oben genannte Möglichkeit zu prüfen, wurden zwei neue Mutanten - am2 und am3 jeweils mit der Immunitätsregion von L - hergestellt. Hierzu wurden die Ausgangsstämme am3 und am2 mit dem Phagen L gekreuzt und auf die jeweiligen am-Mutation (mit Hilfe der entsprechenden Deletionsstämme, siehe Methoden 2.6.21) und auf Su70(sie) selektiert, auf dem nur ein Phage wachsen kann, der beide oder eine der Immunitätsregionen des Phagen L erhalten hat.

Auf diese Weise wurden Hybride folgenden Genotyps erhalten: am2 $c^L I^{P22}$ und am3 $c^L I^L$ (im weiteren werden sie $2 \cdot L$ bzw. $3 \cdot L$ bezeichnet). Ihre DNS wurde nach Infektion von DB 5575 isoliert und in Verpackungsversuchen eingesetzt. DNS aus Infektionen mit $2 \cdot L$ ist wie auch die bisher verwendete DNS aus Infektionen mit $2 \cdot 13 \cdot L$ in Gegenwart von gp3 synthetisiert worden. DNS aus Infektionen mit $3 \cdot L$ dagegen ist bis zum Zeitpunkt des Verpackungsversuchs nicht mit gp3 in Berührung gekommen. Erst wenn sie zu einer Extraktmischung zugefügt wird, ist das möglich.

Die Ergebnisse von Tab. 20 zeigen, daß $3 \cdot L$ -DNS in allen geprüften Extrakt-Kombinationen genauso gut verpackt wird wie $2 \cdot L$ und $2 \cdot 13 \cdot L$ -DNS. Um sicher zu gehen, daß wirklich die exogene 3^- -DNS verpackt wurde, wurden 30 Plaques aus

Tab. 20: Verpackungsexperimente zur Untersuchung von Genprodukt 3; Verpackung von DNS aus 3⁻-Mutanten

Extrakte		pfu/ml auf Su70 (sie) DNS aus den Mutanten		
		am2 am13 c ^L IP22	am2 c ^L IP22	am3 c ^L I ^L
am1 am13+	7,5x10 ⁴		4,6x10 ⁵	1,4x10 ⁵
am2 am13				
am2 am13+	5,0x10 ⁴		1,1x10 ⁶	4,6x10 ⁵
am5 am13				
am2 am13+	4,2x10 ⁵		7,2x10 ⁵	1,0x10 ⁶
am3				

der Titration der Kombination am1+am2 genetisch mit verschiedenen Deletionsstämmen geprüft. 28 der Plaques stammten von 3⁻ 2⁺ 1⁺-Mutanten, 2 waren 3⁺ 2⁺ 1⁺. Es fand offenbar auch keine Rekombination mit DNS aus den Extrakten statt, was denkbar wäre, falls sie nicht vollständig durch das Aufziehen zerstört worden war. Es hätten dann zumindest einige 3⁻ 2⁻ oder 3⁻ 1⁻ Plaques nachzuweisen sein müssen.

Die verwendete am3-Mutante ist sehr leaky. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß so viel gp3 gebildet wird, daß DNS-Moleküle bei der Synthese mit gp3 in Berührung kamen, und diese in in vitro-Versuchen verpackt werden können. Daß alle in vitro-Phagen, die bei der Verpackung von DNS aus einer am3-Infektion, durch Verpackung solcher Moleküle entstanden, ist allerdings unwahrscheinlich, da die DNS, bezogen auf die eingesetzte Konzentration mindestens so gut oder auch besser verpackt wird wie DNS aus am2- (also 3⁺)-Infektionen.

Ein weiteres Indiz dafür, daß die Leakiness der am3-Mutante nicht Grund für erfolgreiche Verpackung mit 3⁻-DNS sein sollte, ist, daß dieselbe am3-Mutante für die Extrakterstellung Verwendung fand (Tab. 19). Eine Kombi-

nation von 2⁻-proheads (die mit am1 erfolgreich gefüllt wurden) mit einem am3-Extrakt bildete keine in vitro-Phagen. Hier hatte die Leakiness der Mutante keinen Einfluß.

Die Erfolglosigkeit von Poteete am3⁻-DNS-Donor-Extrakte mit einem am5-Extrakt zu komplementieren, kann demnach wohl nicht darin begründet sein, daß die DNS während der Synthese nicht mit gp3 zusammentraf.

3. Versuche zu den Kopfgenen 5 und 8

gp5 und gp8 sind Strukturproteine von Kopf bzw. prohead. Sind diese Gene mutiert, werden keine proheads gebildet, die DNS wird nicht geschnitten.

Tab. 21: Verpackungsexperimente zur Untersuchung von Genprodukt 8

Extrakte	pfu/ml auf Su70(sie)
am1 am13+ am8 am13	$< 10^1$
am2 am13+ am8 am13	1×10^5
am3+ am8 am13	7×10^3
am5 am13+ am8 am13	$< 10^1$

Tab. 6 zeigt Ergebnisse von Versuchen mit am8-Extrakten in Kombination mit Extrakten anderer am-infizierten Zellen. Nur mit am3- und am2-Extrakten wurden in vitro-Phage gebildet (siehe auch Tab. 18 und 19). Am8-Extrakte enthalten aktives gp2 und aktives gp3. Erwartungsgemäß verpackt ein am8-Extrakt in Kombination mit einem am1-Extrakt nicht (siehe III.1.). Am5- und am8-Mutanten bilden keine proheads und Köpfe, es werden höchstens aberrante Kopf-

strukturen synthetisiert. So ist nicht verwunderlich, daß in einer Mischung von am5- und am8-Extrakt keine in vitro-Partikel entstehen. In diesem Ansatz müßten proheads in vitro aufgebaut werden, was ein sehr komplizierter Prozess wäre. Das würde auch voraussetzen, daß alle notwendigen Genprodukte in den Extrakten nicht in bereits falsch aggregierter Form vorliegen.

Tab. 22: Verpackungsexperimente zur Untersuchung von Genprodukt 5

Extrakte pfu/ml auf Su70 (siehe)

am1 am13+ 6×10^3

am5 am5 am13

am2 am13+ $6,4 \times 10^5$

am5 am5 am13

am3+

am5 am5 am13 2×10^3

Die Ergebnisse für gp5 sind ähnlich denen für gp8 (siehe Tab. 22), bis auf die der Kombination mit am1-Extrakten, wie in 2.1. erörtert.

4. Zusammenfassung

Mit dem entwickelten in vitro-Ansatz für DNS-Verpackung wurde versucht, Aufschluß über die Funktion einzelner Genprodukte zu gewinnen. Die Ergebnisse von Botstein (Botstein, Waddell, King 1973) über gp10, -16, -20 und 26, die er in vitro-Experimenten gewann, konnten bestätigt werden. Für gp1 ließ sich nicht eindeutig klären, ob gp1-Moleküle in vitro in 1⁺-proheads eingebaut werden können. Die Ergebnisse lassen aber vermuten, daß dies in sehr seltenen Fällen möglich ist. Gp2 kann von allen geprüften Extraktpartnern beigesteuert werden, es entstehen in vitro-Phagen. Für gp3 gilt das ebenfalls, allerdings mit geringerer Effizienz. Auch DNS aus 3⁻-Infektionen wird verpackt. Gp5 und gp8 lassen sich in vitro nicht komplementieren.

C.IV. Untersuchungen zur Struktur und Länge von DNS-Molekülen als Voraussetzung für eine erfolgreiche Verpackung

1. Verpackung von DNS aus Infektionen mit am-Mutanten

Bei Entwicklung des in vitro-Verpackungssystems war davon ausgegangen worden, daß bei Reifung eines P22-Phagen in vivo bei der Replikation überlange DNS-Moleküle synthetisiert werden, die nach Beginn an einer Startersequenz "pac" sequentiell verpackt wird. Es wurde deshalb angenommen, daß auch für eine in vitro-Verpackung DNS-Konkatemere Voraussetzung sind. Außerdem war davon ausgegangen worden, daß die im in vitro-Ansatz angebotene DNS mindestens zum Teilaus überlangen Phagen-DNS-Molekülen besteht. Gradienten radioaktiv markierter DNS ließen diese Annahme zu (Fig. 6).

Es sollte nun geklärt werden, ob nur bei Zugabe überlanger DNS-Moleküle im in vitro-Ansatz verpackt wird oder ob auch DNS von normaler Phagenlänge, also reife DNS, verpackt werden kann. Hierzu wurde zunächst geklärt, wie lang die bisher in in vitro-Versuchen eingesetzte DNS war.

1.1. Untersuchungen mit Hilfe von Gel-Elektrophorese

Zur Beantwortung dieser Frage wurde DNS aus Infektionen von end⁻-Zellen (DB5575) mit 2·13·L, die in in vitro-Verpackungen relativ gute Ergebnisse gebracht hatte, auf 0,8%ige Agarosegele gegeben. Durch Elektrophorese sollte die Länge bestimmt werden. Als Längenkontrolle wurde in eine weitere Spur P22-DNS gegeben. Nach 3-stündigem Lauf bei 60 Volt liegt diese im oberen Drittel der Gelspur (Fig. 15, Spur a). Für 2·13·L-DNS/end⁻ war ein sehr ähnliches Bild zu erhalten (Spur b und d überladen).



Fig.15: Elektrophorese (Agarosegele siehe B.6.12.) verschiedener DNS-Präparate
a) P22 (H5)-DNS, b) DNS aus Infektionen von end⁻-Zellen mit 2.13-L, c) Bandenmuster von H5-DNS nach Verdau mit Eco RI, d) wie b), stark überladen

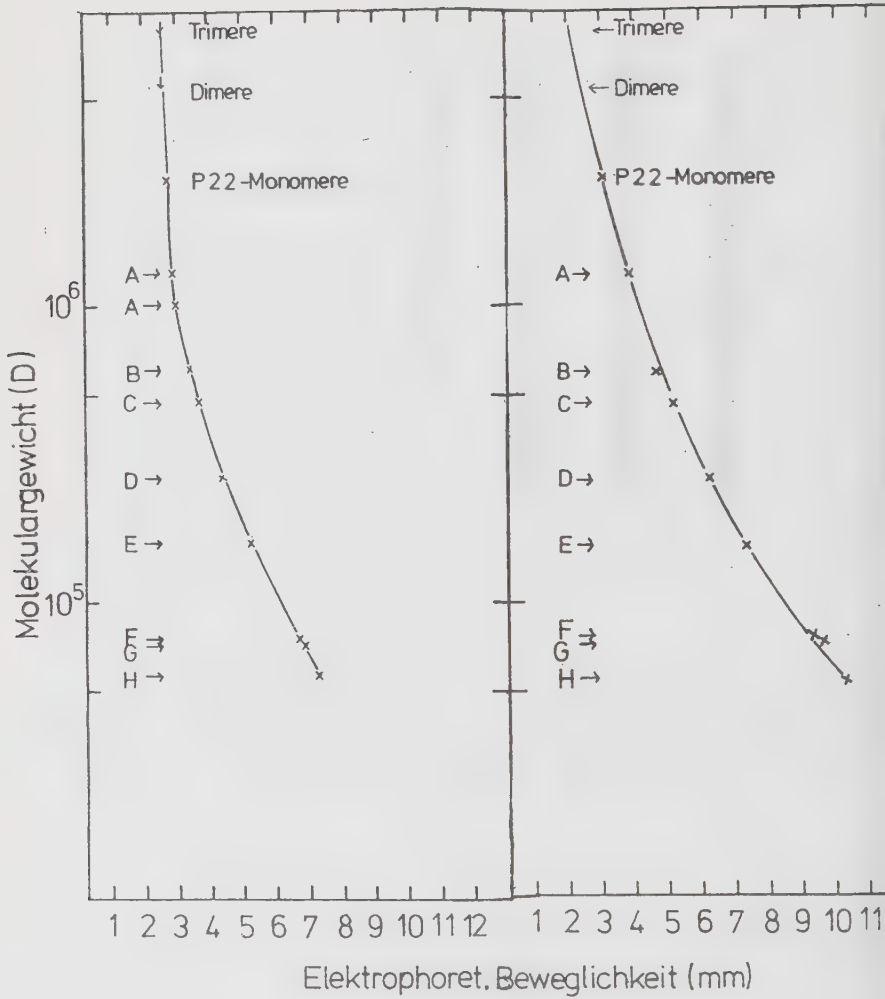


Fig.16: Relative elektrophoretische Beweglichkeit der Eco RI-Fragmente von P22-DNS auf Agarosegelen
a) 0,8%iges Gel, b) 0,4%iges Gel

Im unteren Teil der Spur sind im Unterschied zu P22-DNS-Spur diffuse Bereiche und einzelne dicke Banden vermutlich aus RNS und abgebauter DNS zu sehen. Offenbar wird bei der Präparation die bakterielle DNS weitgehend zerstört. Im oberen Teil der Spur befindet sich nur eine deutliche scharfe Bande genau in der Höhe der reifen P22-DAN. Auch Spur d, auf die sehr viel DNS gegeben wurde, zeigt keine Färbung oberhalb der P22-Bande. Zu erwarten war eine diffuse Färbung in dieser Region, vor allem auch etwas DNS oberhalb der reifen P22-Bande, gebildet durch überlange DNS-Moleküle. Wenn man berechnet, welcher Anteil der DNS in der aufgetragenen Konzentration von den background-Phagen herrühren kann, die reife DNS liefern, kommt man auf maximal 10^6 -Phagengenome, das entspricht etwa 10^{-5} μg DNS. So wenig DNS wäre auf dem Gel keinesfalls sichtbar und kann die scharfe Bande in Höhe der reifen DNS nicht erklären.

Um eine genaue Längenbestimmung zu ermöglichen, wurde in Spur c die Eco RI-Fragmente von P22-DNS getrennt. Auf diese Weise kann man eine Kurve für die elektrophoretische Beweglichkeit von den Fragmenten verschiedener Größe zeichnen und aus dem Kurvenverlauf auf die Beweglichkeit von DNS-Molekülen von mehrfacher Phagenlänge schließen. Fig. 16a zeigt, daß auf einem 0,8%-igen Gel DNS von 1-, 2- und 3-facher Phagenlängemlänge kaum zu trennen ist. Deshalb wurde die Längenbestimmung außerdem mit 0,4%-igen Horizontalgelen durchgeführt. Die Kurve der elektrophoretischen Beweglichkeit verläuft deutlich flacher auch im oberen Bereich (große Molekulargewichte) wie Fig. 16b zeigt. Schon DNS von 2- bis 3-facher Genomlänge müßte sichtbar oberhalb der reifen DNS bandieren. Auch solche niederprozentigen Gele brachten keine anderen Ergebnisse, als 0,8%-ige (Fig. 17, Spur a: P22-DNS, Spur b: $2 \cdot 13 \cdot L$ -end⁻-DNS, Spur c: P22, Eco RI).

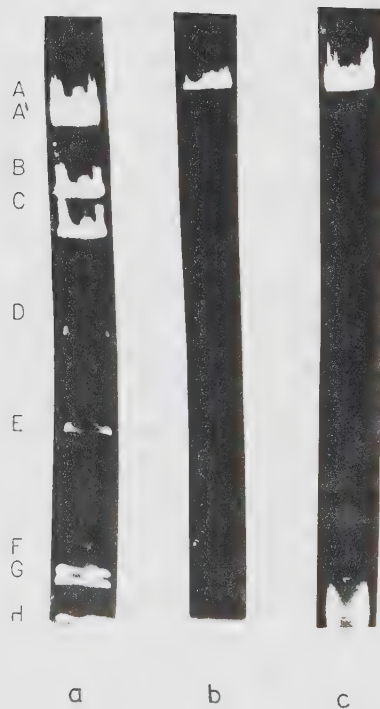


Fig.17: Gelelektrophorese auf einem 0,4%igen Gel
a) P22, Eco RI verdaut, b) P22, ungeschnitten, c) 2-13-L-DNS, ungeschnitten

Auch bei starkem Überladen der Spur ist keine DNS oberhalb der dichten Bande in Höhe der reifen DNS zu entdecken.

Dieselben Bilder erhält man, wenn man DNS aus Infektionen von end⁻-Zellen mit den am-Mutanten in den Genen 1, 2, 3 und 5 in derselben Weise untersuchte. Diese Mutanten tragen keinen L-Anteil, so daß ausgeschlossen sein konnte, daß dieser Anteil irgendeinen Einfluß auf die Länge der DNS hat. Offenbar, ist die Präparationsmethode verantwortlich für das Ergebnis.

1.2. Elektronenoptische Untersuchung

Wenn man von der Annahme ausgeht, daß nur solche Moleküle als Verpackungssubstrat in Frage kommen, die länger als ein Phagengenom sind, so können diese auf Grund der elektrophoretischen Untersuchungen nicht viel länger als reife DNS sein. Da es auf Agarosegelen nicht möglich war, die Länge des Verpackungssubstrats genauer zu bestimmen wurde die DNS elektronenoptisch untersucht. Es wurde DNS von H5, 2·13·L-, und 3·L-Phagen isoliert (reife DNS). Diese liefern DNS von definierter Länge. Außerdem wurde DNS aus Infektionen von end⁻-Zellen mit 2·13·L und 3·L gewonnen, also Extrakt-DNS, die überlange Phagen-DNS-Moleküle unterschiedlicher Länge enthalten sollte. Die DNS Präparate wurden mit Cytochrom c gespreitet, mit Platin beschattet und Fotos der Präparationen angefertigt. Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Präparationen, Fotos und Messungen wurde circuläre PM-2-DNS verwendet, die eine Länge von 3 μ hat.

Fig. 19 und 20 zeigen Fotos von Präparationen Überlanger DNS - 3·L und 2·13·L.

Tab. 1 gibt die Werte der Messungen einzelner DNS-Moleküle aus Präparationen von H5-DNS (also reife DNS), 2·13·L-DNS (reife und aus end⁻-Infektion). und am3 c^L I^L-DNS



Fig. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines DNS-Moleküls aus einer Infektion von end⁻-Zellen mit am3⁺ 1.
(Präparation siehe Fig. 12)

(ebenfalls reife und aus end⁻-Infektion) an. Die aufgeführten Molekulargewichte wurden in folgender Weise ermittelt: Die Länge von H5-DNS-Molekülen und daneben liegende PM2-DNS-Moleküle wurde in Einheiten gemessen. Es zeigte sich, daß für beide die Werte nur geringfügig variierten (für H5 zwischen 29 und 31 Einheiten) (Tab.23a). Der Mittelwert der erhaltenen Werte von H5 wurde errechnet (= 30 Einheiten) und mit dem bekannten Molekulargewicht von H5 gleichgesetzt. Diese beträgt $27,45 \times 10^6$ D (Jackson et al. 1978b). Die für die verschiedenen Moleküle ermittelten Einheiten wurden entsprechend in Molekulargewichte umgerechnet (H5-DNS, Spalte Molekulargewichte). Die Werte schwanken nur um $\pm 0,9 \times 10^6$ D um das als Mittelwert gesetzte Molekulargewicht $= 27,45 \times 10^6$. In derselben Weise wurden die Molekulargewichte für die reife DNS von 2·13·L und 3·L gewonnen. Auch hier wurden die Moleküle jeweils in Einheiten gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß die Messungen bei beiden Hybriden sehr ähnliche Werte wie H5 lieferten, so daß der Mittelwert wieder jeweils gleich $27,45 \times 10^6$ D gesetzt wurde, da die DNS-Moleküle der beiden Phagen offenbar dieselben Molekulargewichte haben wie H5. Die errechneten Molekulargewichte der einzelnen Moleküle schwanken bei 2·13·L etwas mehr um den Mittelwert ($\pm 1,85 \times 10^6$ D) als am3·L-Moleküle ($\pm 0,9 \times 10^6$). Der Wert $27,45 \times 10^6$ D wurde dann auch als Basis für die Bestimmung der Molekulargewichte derjenigen Moleküle verwendet, die aus einer Infektion von end⁻-Zellen mit 2·13·L bzw. 3·L (also Extrakt-DNS) stammten. Aus der Präparation von 2·13·L/end⁻-DNS wurden zehn Moleküle gemessen. Nur sechs sind länger als reife DNS, davon eines etwa zweieinhalb Mal so lang (Tab. 23b). Ähnliches gilt für DNS aus einer 3·L/end⁻-Infektion (Tab. 23c). Es wurden zwischen 26, 13 und $67,93 \times 10^6$ D. Hier sind zwar zehn Moleküle länger als DNS-Monomere, aber nur zwei sind mehr als doppelt so lang.

Tab. 23: Elektronenoptische Messungen einzelner DNS-Moleküle aus Infektionen mit folgenden Phagen: H5 (reife DNS), am2 am13 cLIP²² (reife DNS und aus end⁻-Infektionen) und am3 cL⁻ IL (reife DNS und aus end⁻-Infektionen)

a.

PM2 Einheiten	P22(H5) Einheiten	Molekulargewicht $\times 10^6$ D
8	29	26,53
8,5	30	27,45
8	30	27,45
8	29	26,53
8,5	31	28,36
8	30	27,45
8	31	28,36

m = 30 entspricht 27,45

b.

DNS	Molekulargewicht (D)
2.13.L/reife DNS	$27,45 \times 10^6 \pm 1,85 \times 10^6$

2.13.L/end⁻

Molekül Nr.		
1	23,6	$\times 10^6$
2	27,0	$\times 10^6$
3	27,88	$\times 10^6$
4	30,72	$\times 10^6$
5	31,68	$\times 10^6$
6	33,6	$\times 10^6$
7	34,56	$\times 10^6$
8	45,12	$\times 10^6$
9	45,6	$\times 10^6$
10	74,88	$\times 10^6$

2. Verpackung reifer DNS

2.1. Vergleich der Verpackung reifer DNS mit der von DNS aus amber-Infektionen

Da nicht auszuschließen war, daß im in vitro-System auch DNS aus reifen Phagen verpackt werden kann, sollte das geprüft werden. Hierzu wurde DNS aus den bisher verwendeten DNS-Mutanten nach Isolierung und Reinigung der Phagen über Cs-Cl-Gradienten durch Phenolextraktion gewonnen. Aus folgenden Phagen wurde DNS isoliert und in Verpackungsversuchen eingesetzt: H5, am2 am13 c^L_IP²² am2 c^L_IP²² am3 c^L_IL^L, am5 am13 c^L_IP²² (der von Kreutinger gekreuzt wurde; im weiteren Verlauf der Arbeit wird er 5-13-L bezeichnet) und dem Phagen L. Parallel dazu wurde von jeder Mutante auch end⁻-gezogene DNS zur Verpackung angeboten. Tab. 24 zeigt Versuche mit verschiedenen Extraktkombinationen: am1+am2, am2+am3 und am2+am5.

Wider Erwarten wird DNS aus gereinigten Partikeln sehr gut verpackt; wenn man die jeweils eingesetzte DNS-Konzentration zugrundelegt, viel besser als die "Überlange". Allerdings muß man berücksichtigen, daß die DNS aus end⁻-Infektionen aus Phagen- und Bakterien-DNS besteht. Selbst wenn man annimmt, daß sich diese Anteile wie 1 : 1 verhalten (Schmieger 1970, Ebel-Tsipsis et al. 1972), heißt das noch lange nicht, daß die gesamte Phagen-DNS als lange Moleküle vorliegt. Die bisherigen Untersuchungen zeigten bereits (I.3, IV.1), daß dies offenbar nur für einen sehr kleinen Anteil zutrifft, der sich sicher von Präparation zu Präparation unterscheidet. Die Verpackungshäufigkeit reicht von 10⁻⁵ bis 10⁻³ pro eingesetztem Molekül (berechnet aus der Konzentration). Der Anteil von L-DNS und die am-Mutation spielen hierfür offenbar keine Rolle. Die unterschiedliche Verpackungseffizienz hängt vermutlich von der Qualität der DNS-Präparation ab. Auch reine

Tab. 24: Verpackung "überlanger" und reifer DNS mit verschiedenen Extraktgemischen

Extrakte	überlange DNS aus infiz. end-I-Zellen			pfu/ml auf Su70(sie)	reife DNS aus gereinigten Phagen			L	H5
	3-L	2-L	2-13-L	2-L	3-L	2-13-L	5-13-L		
am1 am13+	1,5x10 ⁵	4,6x10 ⁵	7,5x10 ⁴	1,2x10 ⁸	2,6x10 ⁷	8,7x10 ⁵	4,8x10 ⁵	5,2x10 ⁷	5,0x10 ⁷
am2 am13									
am2 am13+	4,6x10 ⁵	1,0x10 ⁶	5,0x10 ⁴	2,3x10 ⁸	8,1x10 ⁶	5,0x10 ⁶	3,5x10 ⁶	3,0x10 ⁷	1,0x10 ⁸
am5 am13									
am2 am13+		7,1x10 ⁵		1,2x10 ⁸	1,5x10 ⁷			8,5x10 ⁶	8,0x10 ⁷
am3									
am1 am13+				1,2x10 ⁸	1,0x10 ⁸	2,1x10 ⁶	2,5x10 ⁶		
am2 am13									
ingesetzte DNS-Menge	(0,52µg)	(1,1µg)	(0,7µg)	1,4µg	0,34µg	0,4µg	0,22µg	0,14µg	1,6µg
Häufigkeit/ DNS-Molekül (max.)				1x10 ⁻³	1x10 ⁻³	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁵	2x10 ⁻³	5x10 ⁻⁴

Fig.21

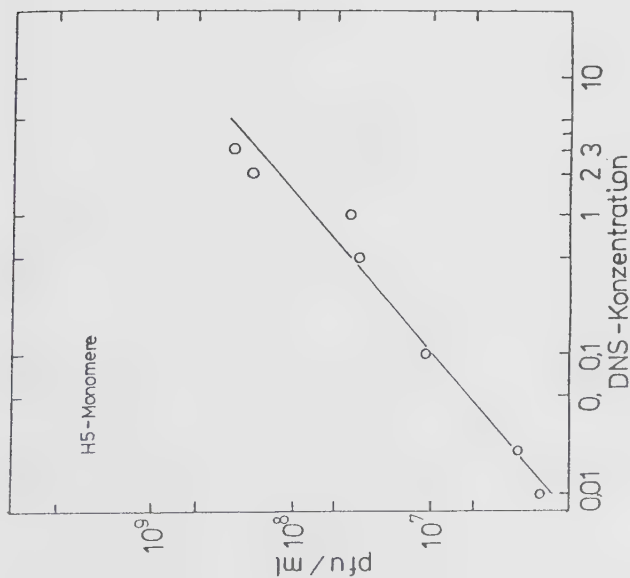


Fig.22

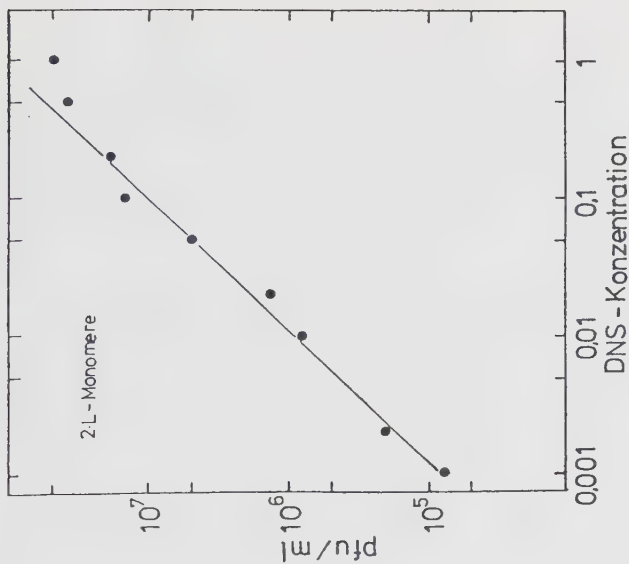


Fig.21 und 22: Verpackung reifer DNS:

Einem Gemisch aus einem am1 am13- und einem am2 am13-Extrakt wurde DNS aus gereinigten Phagen zugegeben. Fig. 21: DNS aus H5-Phagen, Fig.22: DNS aus 2-L-Phagen

L-DNS läßt sich genauso effektiv verpacken wie P22- oder Hybrid-DNS. Wenn die zugegebenen DNS-Monomere verpackt wurden, sollte sich die Ausbeute an in vitro-Phagen mit zunehmender Konzentration der DNS erhöhen. Fig. 21 und 22 zeigen Versuche in denen den Extraktgemischen am1+am2 DNS in steigender Konzentration zugefügt wurde.

Der Titer der in vitro-Phagen steigt proportional zur zugegebenen DNS-Menge. In beiden Fällen wurde kein plateau erreicht. Die Extraktkapazität würde also für noch mehr verpackbare DNS ausreichen. Auffallend ist auch folgendes: Rechnet man die jeweils eingesetzte DNS-Konzentration in Phagenmoleküle um, ergibt sich für jede Konzentration, daß nur jedes 500ste Molekül (2·L) bzw. nur jedes 1000ste Molekül (H5) verpackt wird. Nicht die Verpackungsaktivität der Extrakte ist limitierend, sondern die Konzentration derjenigen DNS-Moleküle, die die richtigen Voraussetzungen mitbringen, verpackt zu werden.

2.2. Rekombination mit Extrakt-DNS findet nicht statt

Möglicherweise sind in den Verpackungsansätzen mit DNS-Monomeren nur Moleküle verpackt worden, die vorher mit der DNS der Extrakte, die vielleicht nicht vollständig zerstört war, rekombiniert hatten. Hierdurch würden solche Moleküle länger geworden sein und Konkatemere bilden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden mehrere Einzelplaques von Platten, auf die verschiedene Verpackungsansätze mit Su70(sie) plattiert worden waren, genetisch untersucht. Dazu wurden die Platten auf geeignete DB-Stämme gestempelt und außerdem 100-150 Einzelplaques im Komplementationstropftest mit verschiedenen am-Mutanten geprüft. Die untersuchten Extrakt-DNS-Kombinationen waren:

- a. am1+am2 mit DNS von 3·L,
- b. am2+am3 mit DNS von 2·L,
- c. am2+am5 mit DNS von L.

Bei Rekombination der zugegebenen DNS mit der DNS eines der Extraktpartner müßten unter den in vitro-Phagen bei a. am1 am3- und am2 am3-Doppelmutanten, bei b. außer den am2-plaques auch am2 am3-Doppelmutanten, bei c. am2- und am5-plaques zu finden sein. Tab. 25 zeigt das Ergebnis. Alle geprüften plaques hatten den Genotyp der zugegebenen DNS, bis auf einige plaques, die nicht mehr amber waren, da vermutlich Rekombination mit dem Prophagen des Indikatorstamms Su70(sie) stattgefunden hatte. Partikel mit zwei amber-Mutationen, wie sie für Kombination a. und b. gefordert wären, waren nicht zu finden. Bei Verpackung von L-DNS (c) entstanden nur in vitro-Partikel, die keine am-Mutation hatten und auf L-lysogenen Indikator nicht wachsen konnten. Die in vitro-Phagen sind demnach nicht durch Rekombination der zugegebenen reifen DNS mit extrakteigener zustandegekommen.

Tab. 25: Prüfung von Einzelplaques von in vitro-Phagen auf Rekombination der verpackten DNS mit Extrakt-DNS

Extrakte	Genotyp der verp. DNS	Anzahl der ge- prüft. EPs	Genotyp
am1 am13+ am2 am13	am3 c ^L I ^L	100	5x2 ⁺ alle anderen 2 ⁺ 1 ⁺ 3 ⁺ 5 ⁺
am2 am13+ am3	am2 c ^L I ^{P22}	150	10x2 ⁺ alle anderen 2 ⁻ 1 ⁺ 3 ⁺ 5 ⁺
am2 am13+ am5 am13	L	100	alle L (wachsen nicht auf Su70(L)) kein amber

2.3. Versuch, die Struktur der DNS-Moleküle, die verpackt werden, zu klären

Es stellt sich die Frage, wie es möglich ist, daß in vitro DNS-Moleküle mit der Länge von reifer DNS verpackt werden. Die Verpackung sollte nach P22-Modus ablaufen, da alle Vorstufen und Enzyme in den Extrakten aus dem P22-System stammen. Nur die angebotene DNS besteht teilweise oder nur aus L-Anteilen. Die bisherigen Kenntnisse machen das in der Einleitung ausgeführte Modell wahrscheinlich: Der erste Schnitt auf einem Konkatermer erfolgt an der pac-site, von da aus wird verpackt. Da 2% mehr verpackt werden als einem Gensatz entsprechen würde, liegt der 2. Schnitt etwas jenseits der 2. pac-site. Die Verpackung verläuft sequentiell weiter, es wird vom Konkatermer immer soviel verpackt, wie in einen Phagenkopf hineingehen. Die pac-Sequenz liegt bei diesen Molekülen unterschiedlich weit von einem Molekülende entfernt.

Es ist denkbar, daß bei der Verpackung reifer DNS nur solche Moleküle verwendet werden, die mit pac beginnen, also nur erste head-fuls, die in einer Phagenpopulation etwa 30% ausmachen. Dann sollten alle in vitro-Phagen an einem Ende ihrer DNS die pac-Sequenz tragen.

Um diese Möglichkeit zu klären wurde folgendermaßen vorgegangen (Einzelheiten siehe unten): DNS-Monomere wurden durch Nick-Translation mit ^{32}P markiert und anschließend in einem Verpackungsansatz eingesetzt. Die gebildeten in vitro-Phagen gemeinsam mit den background-Phagen der Extrakte wurden isoliert und einer Analyse mit der Restriktionsnuklease Eco RI unterworfen. Bei Autoradiographie des Trennungsgels sind nur solche Fragmente sichtbar, die von den in vitro-Phagen stammten. Ich machte mir also zwei Methoden zunutze - Nick-Translation und Analyse von DNS mit der Restriktionsnuklease Eco RI:

a.

- Die Nick-Translation-Reaktion, die von der E.coli DNA-Polymerase I katalysiert wird, wird verwendet, um nicht-markierte Nukleotide einer doppelsträngigen DNS durch radioaktive (^{32}P) zu ersetzen. Auf diese Weise kann bereits isolierte und gereinigte DNS nachträglich in vitro markiert werden. In der Reaktion werden an Stellen, an denen die DNS einen Einzelstrangbruch (nick) mit einem 3'-OH-Ende enthält, durch die Polymerase I Nukleotide am 3'-OH-Ende eingefügt, während gleichzeitig weitere Nukleotide von der anderen Seite durch 5'- zu 3'-Exonukleaseaktivität, die integrierter Bestandteil des Enzyms ist, entfernt werden. Als Konsequenz wandert der Einzelstrangbruch an dem DNS-Molekül in 5' zu 3'-Richtung entlang. Die Sequenzen der Nukleotide, die am 3'-OH-Ende des nick eingebaut werden, werden durch den Komplementärstrang bestimmt und entsprechen deshalb der Reihenfolge der Nukleotide, die von der 5'-Seite her entfernt werden. Wenn die Nukleotide radioaktiv sind, wird die neu synthetisierte DNS radioaktiv markiert. Für Eco RI-Fragmente von λ -DNS, die auf diese Weise markiert wurden, wurde eine spezifische Aktivität von 3×10^8 cpm/ μg erreicht (Rigby et al. 1977, Amersham - Technical bulletin 80/3: Labelling of DNA with ^{32}P by nick translation).

b.

Als zweites sollte in diesem Experiment eine Charakterisierung der DNS der in vitro-Phagen mit Eco RI durchgeführt werden.

- Restriktions-Nukleasen schneiden an bestimmten DNS-Basensequenzen. Sie können inzwischen aus verschiedensten Mikroorganismen isoliert werden (Roberts 1977). Je nach Restriktionsenzym und Herkunft der verdauten DNS ergibt sich ein ganz bestimmtes Bandenmuster, wenn die Fragmente auf Agarosegelen durch Elektrophorese getrennt

werden. Die Restriktionsnuklease Eco RI aus *E.coli* RY13 erkennt die Sequenz 5'...GAATTC...3'. und schneidet zwischen G und A (Hedgpeth et al. 1972). Das Molekulargewicht der Fragmente, die bei Behandlung von P22-DNS mit diesem Enzym entstehen, ist bekannt und die Bruchstücke sind der genetischen Karte zugeordnet (Jackson et al. 1978a). P22-DNS liefert 8 Fragmente A-H. Die D-Bande wird durch einen Eco RI-Schnitt einerseits und den pac-Schnitt andererseits begrenzt. Sie kann nur aus den ersten headfuls hervorgehen und liegt daher unterrepräsentiert vor (siehe Fig. 23, in der das ringförmige P22-DNS-Molekül mit den Eco RI-Schnittstellen und der pac-site abgebildet ist. Spiralförmig um dieses Molekül ist ein DNS-Konkatemer gezeichnet, in das die jeweiligen Schnitte eingezeichnet sind, die entstehen, wenn die Verpackung, nachdem sie an pac begonnen hat, nach dem headful-Modus und sequentiell verläuft.) Schneidet man DNS aus in vitro-Phagen sollte in die Bande D dieselbe Menge an Fragmenten enthalten sein wie in den anderen Banden, wenn die eingangs dargestellte Verwendung zutrifft, daß nur DNS-Moleküle verpackt werden, die mit der pac-Sequenz beginnen, also nur DNS von ersten headfuls, verpackt werden.

Mit der oben beschriebenen Methode wurde H5-DNS mit ^{32}P markiert und in einem in vitro-Ansatz eingesetzt. Ein Aliquot wurde auf Su70(sie) titriert. Ein Aliquot der DNS war nicht in den Verpackungsversuch eingesetzt worden, sondern mit Eco RI verdaut und die Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt worden. Eine Autoradiographie dieser Kontrolle zeigte alle 8 P22-Banden, D war deutlich schwächer. Die gebildeten in vitro-Phagen und die background-Phagen der Extrakte wurden, nach Behandlung mit DNase I, um restliche markierte DNS zu entfernen, über Cs-Cl-Gradienten konzentriert und gereinigt. Ihre DNS wurde isoliert, mit Eco RI geschnitten und die Fragmente durch Elektrophorese getrennt. Bei Autoradiographie soll-

ten nur solche Fragmente sichtbar sein, die von der in vitro-Phagen-DNS stammen. Eine Klärung der Frage, ob die Bande D unterrepräsentiert ist oder im gleichen molaren Verhältnis auftritt, wie die anderen Banden war nicht möglich. Das hatte vor allem zwei Gründe: einerseits war die Markierungsdichte sehr gering $10^5 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ eingesetzter DNS. Ein Grund hierfür könnte sein, daß die DNS nicht genügend nicks enthielt, um eine ausreichende Markierungsreaktion einzuleiten, oder aber für so lange DNS, wie es ganze P22-DNS darstellt, ist die Nick Translationmarkierung keine geeignete Methode. Die DNS könnte im Laufe der Prozedur mechanisch zerstört worden und so zum großen Teil verloren gegangen sein.

Außerdem wurde die markierte DNS schlecht verpackt. Es wurde nur ein Titer von $1,5 \times 10^7/\text{ml}$ in vitro-Phagen erhalten. Es ist nicht auszuschließen, daß auf diese Weise markierte DNS wegen einer Schädigung der DNS im Laufe der Prozedur prinzipiell schlecht oder gar die markierten Moleküle gar nicht verpackt werden. Aus den beiden genannten Gründen- mangelhafte Markierung und Verpackung - reichte selbst der verwendete Ansatz von 2ml nicht aus, ein Ergebnis zu erhalten.

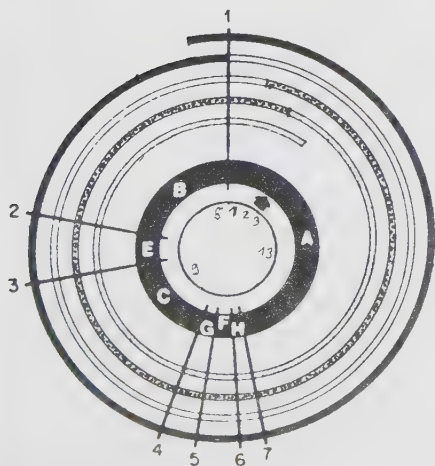


Fig.23:
Verpackungsmodell nach Jackson (1978 a,b):
Um das Genom von P22 ist spiralförmig ein DNS-Kontaktemer gezeichnet. Außer den Fragmentbezeichnungen (Buchstaben) und Genen (Zahlen) sind die Eco RI-Schnittstellen (durchgezogene Linien) und die pac-site (Pfeil) angegeben. Die Verpackung des ersten headful beginnt bei pac im Fragment A. Es wird etwas mehr DNS verpackt als einem Gensatz entspricht (innerer weißer Abschnitt). Der zweite Headful beginnt mit dem Endschnitt des ersten (punktierter Abschnitt der Spirale) usw.

3. Zusammenfassung

Die im in vitro-Ansatz eingesetzte DNS wurde durch Gelelektrophorese und elektronenoptisch untersucht. Obwohl die DNS aus Infektionen von end⁻-Zellen mit am-Mutanten stammte, war sie zu einem großen Teil zu kleinen Bruchstücken abgebaut. Ein Teil ist nur wenig länger als einem Phagegenom entspricht.

DNS aus gereinigten Phagen wird im in vitro-Ansatz ebenfalls verpackt. Auch L-DNS wird genauso gut verpackt wie DNS aus P22 und P22-L-Hybriden.

Die Frage ob reife Moleküle nur verpackt werden, wenn sie mit der pac-site beginnen, konnte wegen experimenteller Mängel bei Markierung der DNS durch nick-Translation und bei der Verpackung der markierten DNS nicht geklärt werden.

C.V. Bestimmung der Dichte des Phagen L und der P22-L-Hybride

Um geeignete DNS für den in vitro-Verpackungsansatz zu erhalten, waren P22-am-Mutanten mit dem Phagen L gekreuzt worden (siehe I. und III.). Es wurden Hybride selektiert, die eine oder beide Immunitätsregionen von L, die amber-Mutation von P22 erhalten hatten. Die Phagen L und P22 zeigen morphologisch und serologisch große Ähnlichkeit miteinander (Bedzek, Amati 1967; Amati 1968). Die Autoren Kahmann und Prell wiesen 1971 die funktionelle und lokale Analogie vieler Gene nach, was Bedingung war für die Austauschbarkeit von Genen zwischen P22 und L. Sie zeigten, daß viele amber-Mutanten von P22 durch L-Gene komplementiert werden können.

Um zu prüfen, ob auch die von mir verwendeten amber-Mutanten von P22 in den Genen 1, 2, 3, 5 und 8 von L-Genen komplementiert werden, wurden diese amber-Mutanten auf einen vorplattierten Rasen aus LT2(L) getropft. Bei allen war Lyse zu beobachten, d. h. daß Markerrescue möglich war. Zur genaueren Charakterisierung der Hybride sollte ihre Dichte und die Dichten von L und P22 bestimmt werden. Bedzek und Amati (1967) beschrieben für P22 und L einen unterschiedliche Dichte. Für L gaben sie einen Wert von 1,505, für P22 1,515 g/cm³ an. Die Dichte von P22 liegt nach Messungen von Backhaus (Backhaus, Schmieger 1974) bei 1,508 g/cm³. Der Unterschied der Dichten der beiden Phagen P22 und Phage L, kann entweder bedingt sein durch verschiedene Molekulargewichte der DNS oder auch durch unterschiedlichen Proteingehalt bzw. unterschiedlichen Bau der Köpfe. Bedzek und Amati (1967) errechneten für L 16% mehr Protein. Die Größe der Köpfe der beiden Phagen soll aber auf Grund von elektronenoptischen Messungen gleich sein. Für die DNS vermuten sie gleiches Molekulargewicht für beide Phagen. Kreutinger konnte mit Polyacrylamidgelen zeigen, daß die Köpfe

von L und 3·L aus denselben Proteinen bestehen wie P22, bis auf den Unterschied, daß gp16 beim Phagen L zu fehlen scheint (Fig. 24). Auch die Mengenverhältnisse der Proteine zueinander sind offenbar sehr ähnlich. Es ist also nicht auszuschließen, daß L oder auch eines oder alle Hybride eine geringere Dichte haben als P22, da ihre DNS möglicherweise doch kürzer ist. Phagenpartikel, die durch in vitro-Verpackung einer solchen kürzeren reifen DNS in P22-Köpfe gebildet werden, sollten dann eine niedrigere Dichte aufweisen als P22. Wenn aber die DNS die aus Extrakten infizierter end⁻-Zellen stammen, also Konkatemere, als Substrat dienen, sollten die in vitro-Partikel, wenn nach dem headful-Modus verpackt wird, die Dichte von P22 haben.

Deshalb wurden zum einen die Dichten von L und den P22-L-Hybriden, die zur DNS-Isolierung verwendet wurden, bestimmt, zum anderen die Dichte der in vitro-Partikel nach Verpackung reifer DNS und Überlanger DNS von den verschiedenen Rekombinanten und L.

1. Dichte der Phagen

Die Dichten der verschiedenen Hybride und L und P22 wurden in linearen Cs-Cl-Gradienten bestimmt. Als Referenz diente jeweils der P22-Wildtyp H5. Die Molekulargewichte der jeweiligen DNS wurden ebenfalls ermittelt (siehe Teil VI). Fig. 25b zeigt, daß H5, 2·13·L und 3·L gleiche Dichte, nämlich 1,508 bzw. 1,506 g/cm³, haben. Die Phagen L und 2·L haben eine Dichte von 1,499 g/cm³. (Fig. 25c, d). Der von Bedzek und Amati (1967) beschriebene Dichteunterschied zwischen den Phagen P22 und L konnte also bestätigt werden. Wie bei diesen hat L eine geringere Dichte als P22.

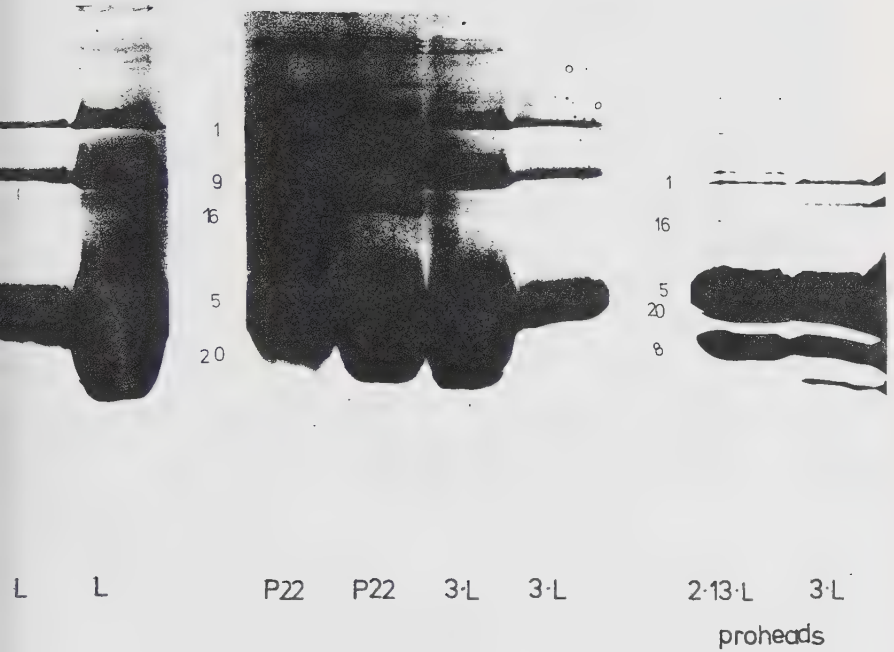


Fig.24: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteinuntereinheiten aus Köpfen und proheads der Phagen:
a) P22, b) L, c) 3-L, d) 3-L, proheads
(3L prohead-Präparation ist verunreinigt mit gp9, dem Schwanzprotein)

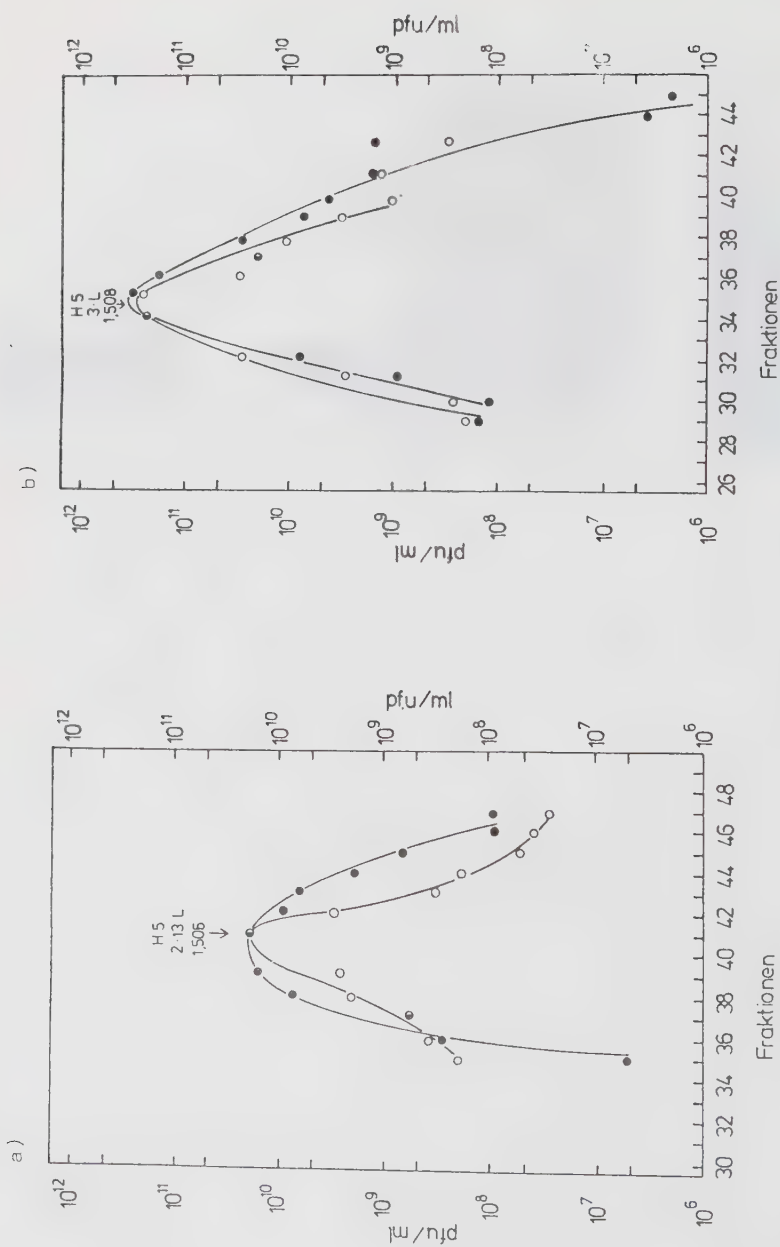


Fig. 25: Dichtebestimmungen des Phagen L und der P22-L-Rekombinanten auf linearen CsCl-Gradienten. Als Referenz diente jeweils H5 (o-o-o). Die Fraktionen wurden auf LT2, (auf dem H5 und L wachsen) und auf Su70(sie), auf dem L und die H5-Rekombinanten plattiert (●-●-●).

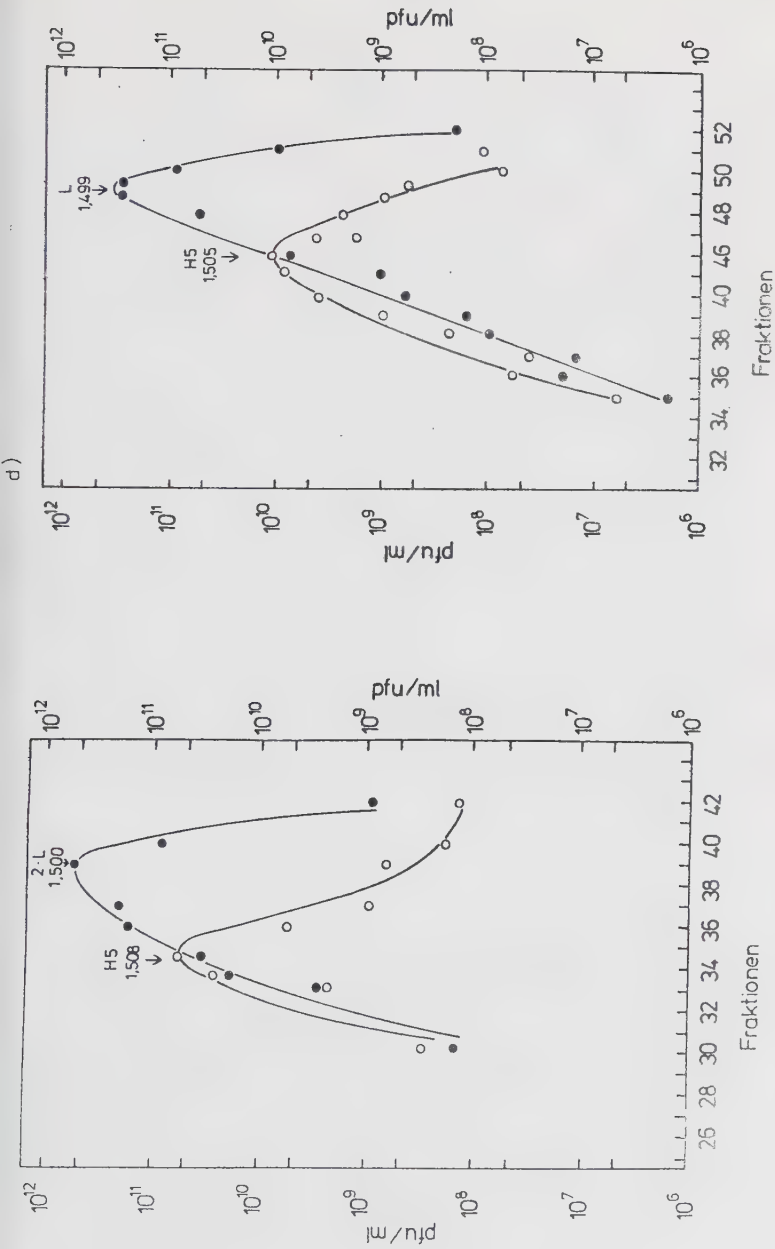


Fig. 25

2. Dichte der in vitro-Phagen

Bei der Bestimmung der Dichte der in vitro-Phagen wurden sowohl diejenigen untersucht, die durch Verpackung reifer DNS entstanden, als auch diejenigen, die DNS aus infizierten end⁻-Zellen verpackt hatten. Nach einem Verpackungsversuch wurden alle Phagen eines Extraktgemisches nach CHCl₃-Zugabe auf einen linearen CsCl-Gradienten gegeben. Die background-Phagen der Extrakte (=P22) dienten als Referenz. Die Fraktionen wurden auf Su70 (background-Phagen + in vitro-Phagen) und auf Su70(sie) (in vitro-Phagen) titriert. In allen Fällen bildeten die Fraktionen mit den höchsten Referenztitern, also P22, auch den peak für die in vitro-Phagen (Fig. 26, Fig 27). Die in vitro-Phagen verhalten sich in der Dichte wie normale P22-Phagen. Das Molekulargewicht der DNS von L und 2·L, die beide als reife Phagen eine andere Dichte als P22 haben, muß dem von P22 weitgehend gleichen, ansonsten hätten die in vitro-Phagen nach Verpackung reifer DNS eine niedrigere Dichte als P22, nach Verpackung von Konkatemeren aber P22-Dichte zeigen müssen. Die Dichtedifferenz bei den verschiedenen Phagen muß somit durch den Kopf bedingt sein.

3. Zusammenfassung

Die Dichten der Phagen P22 (1,508) und L (1,499) und der P22-L-Rekombinanten (2·13·L und 3L = P22-Dichte, 2·L = L-Dichte) wurden bestimmt. Außerdem wurde die Dichte der in vitro-Phagen nach Verpackung von reifer DNS und nach Verpacken von DNS aus infizierten end⁻-Zellen bestimmt. Sie gleicht in jedem Fall der Dichte von P22.

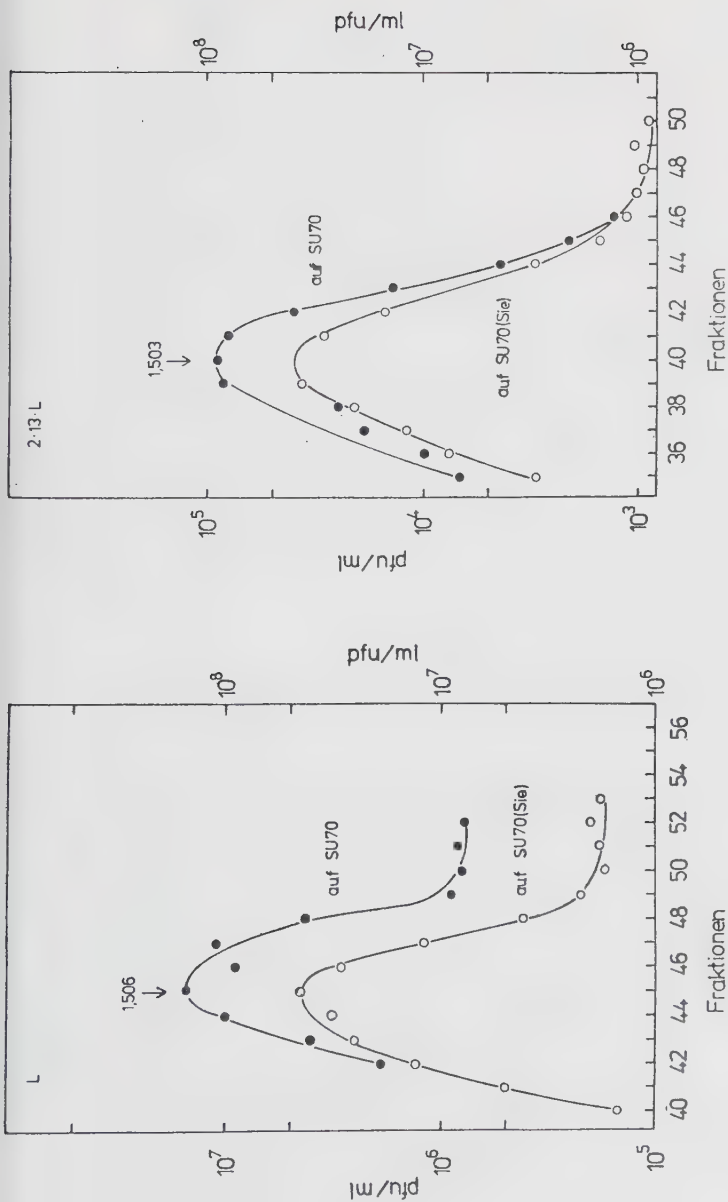
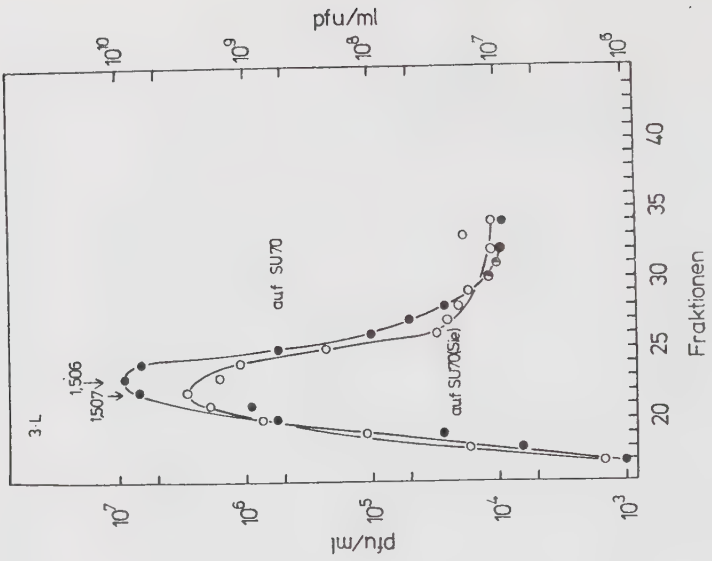


Fig. 26: Dichtebestimmungen der Phagen eines in vitro-assays nach Verpackung von DVS aus reifen Phagen. Die Fraktionen wurden auf Su70, auf dem die background-Phagen der Extrakte und die in vitro-Phagen wachsen, und auf Su70(Sie), auf dem nur die in vitro-Phagen wachsen, plattiert. a) L, b) 2.13.L, c) 2.L, d) 3.L

d)



c)

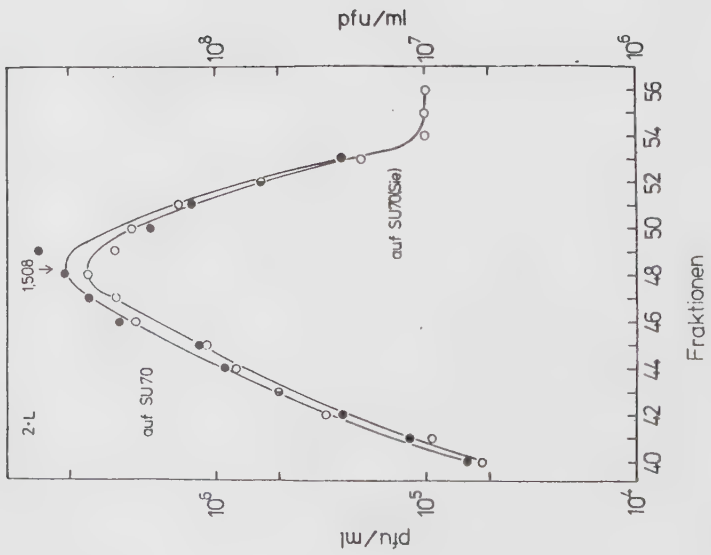
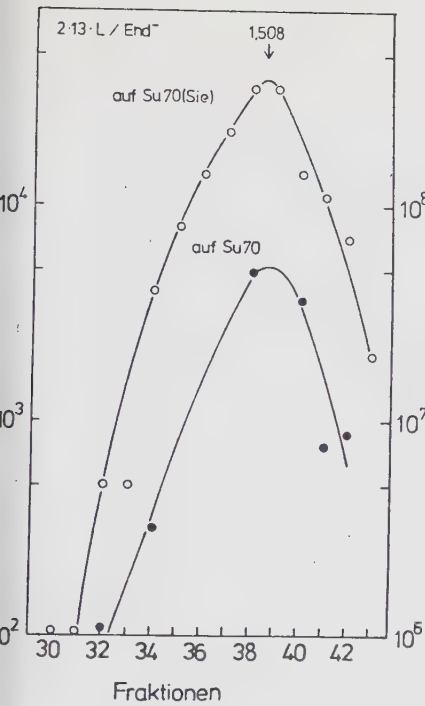


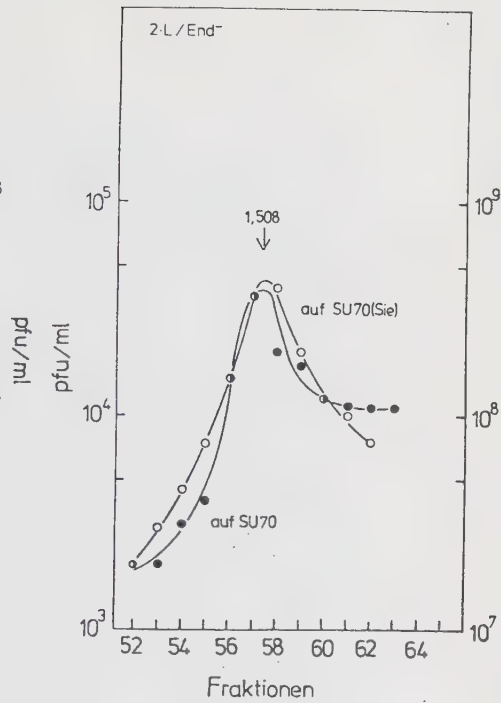
Fig. 26

a)

-127-



b)



c)

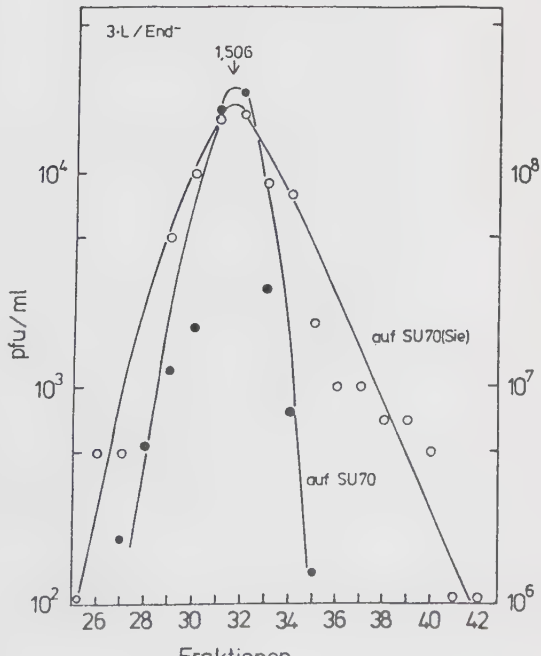


Fig.27:
Dichtebestimmung von Phagen
eines in vitro-assays nach
Verpackung von DNS aus infi-
zierten end⁻-Zellen:
Zur DNS-Präparation wurde
der end⁻-Stamm mit verschie-
denen amber P22-immL-Rekom-
binanten infiziert und
45 bis 60 Minuten inkubiert.
Bestimmung der Titer der
Fraktionen siehe Fig.26.
a) 2.13 · L / end⁻,
b) 3 · L / end⁻,
c) 2 · L / end⁻

C.VI. Charakterisierung der DNS, die im Verpackungssystem eingesetzt wird

1. Charakterisierung der reifen DNS

Als Arbeitshypothese kann man davon ausgehen, daß die Verpackung im in vitro-Ansatz nach dem P22-Modus abläuft, da alle Vorstufen und ENzyme, die dazu notwendig sind, aus den Extrakten stammen, die mit P22-Mutanten infiziert wurden. Auch L-DNS wird, wie bereits gezeigt wurde (IV.2), vom P22-Verpackungssystem angenommen. L-DNS sollte also, wenn das bisher entwickelte Modell für die P22-DNS-Verpackung richtig ist, eine pac-site oder ähnliche Sequenzen haben, die von P22 erkannt werden. Es ist völlig unbekannt, ob der Phage L selbst nach dem gleichen Mechanismus verpackt wie P22. Es gibt bisher keine genetische Analyse für den Phagen L. Kreutinger stellte mit Hilfe von Polyacrylamid-Gelen fest, daß die Köpfe von L und die Köpfe und proheads von 3·L aus Proteinen aufgebaut sind, die dieselben Molekulargewichte haben wie die P22-Proteine 5, 8 und 1. Außerdem ist Markerrescue, wie in V. beschrieben, von vielen am-Mutationen von P22 mit L-Genen möglich, insbesondere mit solchen der Kopfstrukturen und Reifungsfunktionen (Kahmann und Prell 1971). Auch die von mir verwendeten am-Mutationen in den Genen 1, 2, 3, 5 und 8 sind durch L komplementierbar, wie ich im Tropftest feststellen konnte (siehe V). Es ist also wahrscheinlich, daß sich die beiden Phagen P22 und L in ihrem Verpackungsmechanismus sehr ähneln oder gar gleichen.

Jackson et al. (1978a,b) konnten durch Eco RI-Analyse wichtige Informationen über die Verpackung bei P22 gewinnen. Deshalb sollte versucht werden, auch über den Phagen L und die P22-L-Rekombinanten Kenntnisse über den Verpackungsmodus mit Hilfe der Eco RI-Restriktionsmuster zu erhalten.

Die L-P22-Hybride müssen entweder die pac-Region von P22 erhalten haben oder/und entsprechende L-Sequenzen. Es sollte deshalb geklärt werden, ob bei L und den Hybriden nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym Eco RI "D"-Banden, also unterrepräsentierte Banden zu finden sind. Bei P22 entsteht die D-Bande durch einen Eco RI-Schnitt und den pac-Schnitt (Jackson et al. 1978 a,b). Möglicherweise tritt bei L eine unterrepräsentierte Bande von anderem Molekulargewicht auf, da die vermutete pac-Sequenz von L nicht in derselben Entfernung zu einer Eco RI-Schnittstelle liegen muß, wie die pac-Sequenz von P22. Liegt die pac-site von L nicht an einer analogen Stelle zu der von P22, also in der Region der Verpackungsgene, ist es denkbar, daß die Hybrid-DNS zwei pac-Sequenzen trägt und die Verpackung von diesen beiden aus erfolgt. Auch das müßte im Bandenmuster nach Eco RI-Behandlung erkennbar sein. Die Eco RI-Fragmente von P22 sind der genetischen Karte zugeordnet. Für L gibt es keinerlei Analysen mit Restriktionsnukleasen.

1.1. Analyse mit Eco RI

Die DNS von P22, L und den Hybridphagen wurde mit Eco-RI behandelt und die Fragmente durch anschließende Gelelektrophorese aufgetrennt. Fig. 28a, Spur a bis f zeigt die Bandenmuster der Elternphagen und der Hybridphagen, wobei zur Bestimmung der Molekulargewichte der L und Hybridfragmente die bekannten Molekulargewichte der P22-Banden (Jackson et al. 1978b) als Grundlage verwendet wurden. Fig. 28b zeigt die elektrophoretische Beweglichkeit der L- und P22-Fragmente. Durch Anlegen einer Kurve durch die P22-Punkte lassen sich die Molekulargewichte der L-Fragmente bestimmen. Tab. 26 gibt die Molekulargewichte der einzelnen Fragmente von L, P22, und den P22-L-Rekombinanten an. P22-Fragmente werden in den Ta-

bellens und Figuren immer mit Großbuchstaben bezeichnet, also auch diejenigen, die in den L-P22-Rekombinanten von P22 stammen. Die Fragmente von L sind mit kleinen Buchstaben beschriftet, außer Bande D, die der von P22 im Molekulargewicht gleicht und, wie noch gezeigt wird, denselben Ursprung hat.

P22 (Spur a)

Bei Verdau von P22-DNS mit Eco RI entstehen 8 Banden, eine davon - D - ist unterrepräsentiert. Die Molekulargewichte der Fragmente und ihre Zuordnung zur Genkarte ist bereits bekannt (Jackson et al 1978 a,b).

Phage L (Spur b)

Das Bandenmuster zeigt sieben Banden. Hiervon haben zwei Molekulargewichte von P22-Fragmenten, nämlich a, das B gleicht, und die schwach sichtbare Bande in Höhe der D-Bande von P22. Da diese Bande unterrepräsentiert ist, ist anzunehmen, daß sie in derselben Weise zustandekommt, wie die D-Bande von P22: sie stammt aus den Phagenpartikeln, die durch Verpackung von der pac-Sequenz aus, also dem ersten headful, gebildet wurden. Das Fragment wird durch den pac-Schnitt und einen Eco RI-Schnitt begrenzt. Dieser liegt bei L offenbar in derselben Entfernung zu pac wie bei P22. Die Bande wird aus diesen Gründen als D bezeichnet.

Diese D-Bande ist wie beim Phagen L bei allen Hybriden zu finden. Außer bei 5.13.L ist sie deutlich schwächer als bei P22. Die übrigen Banden von L haben andere Molekulargewichte als P22-Fragmente. Gele, auf die wenig DNS aufgetragen wurde, machen wahrscheinlich, daß die zweite Bande aus zwei Fragmenten gebildet wird. Man sieht auf solchen Gelen eine zweite Bande, die viel stärker ist als die erste. Daher wurde diese auch als b, c-Bande bezeichnet.

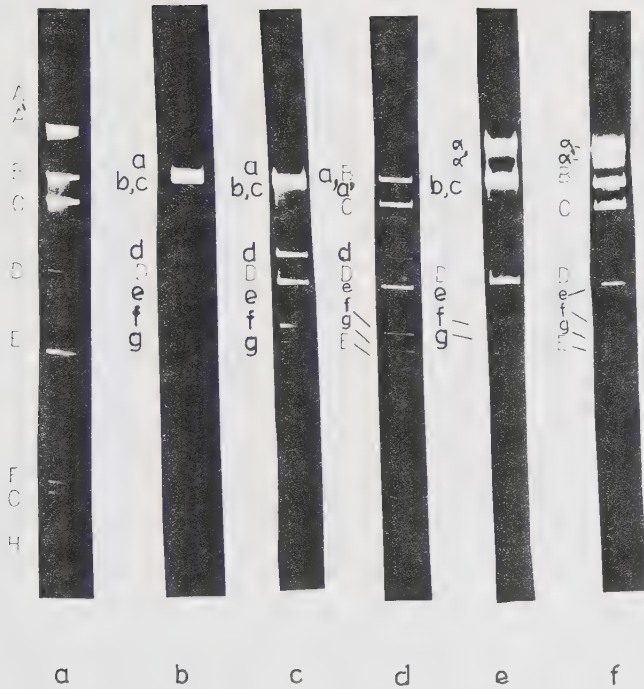


Fig.28a) Bandenmuster der DNS aus reifen Phagen nach Behandlung mit Eco RI und anschließender Gelelektrophorese auf einem 0,8%igen Agarosegel

a) P22, b) L, c) 2·L, d) 2·13 L, e) 3·L f) 5·13 L

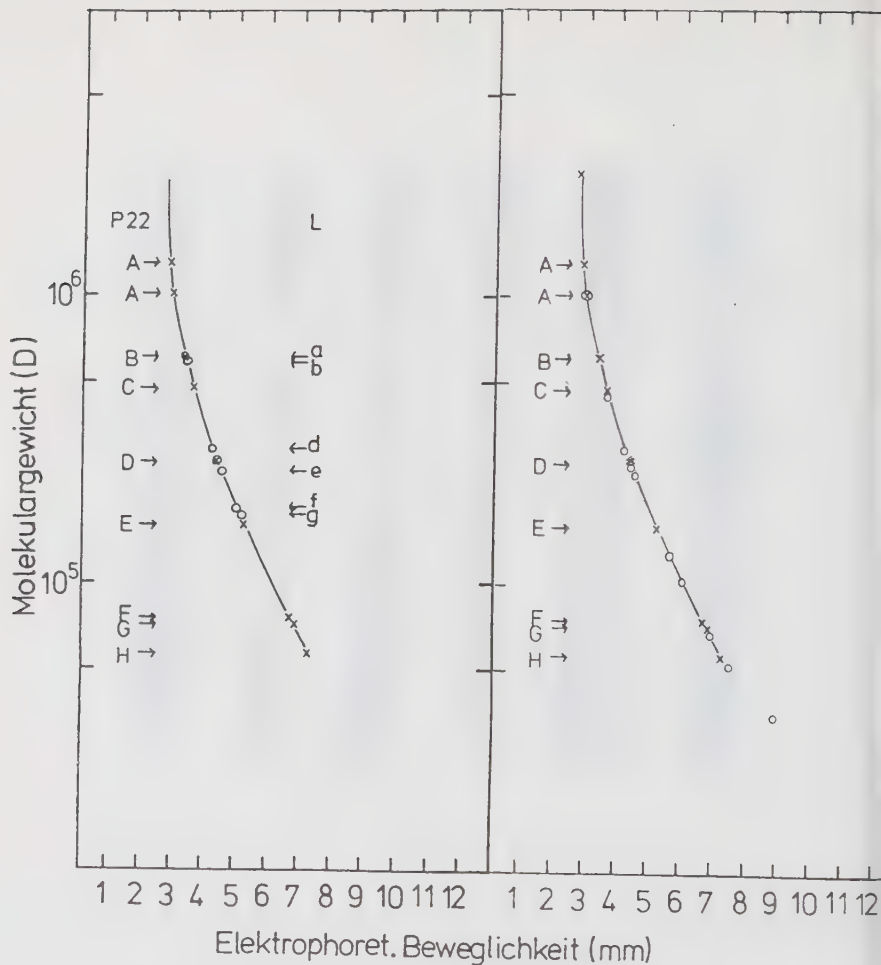


Fig.28b) Molekulargewichtsbestimmung der Eco RI-Fragmente des Phagen L
Die relative Beweglichkeit der P22-Fragmente wurde gegen ihr bekanntes Molekulargewicht aufgetragen. Anhand der relativen Beweglichkeit der L-Fragmente kann deren ungefähres Molekulargewicht bestimmt werden.

Fig.29b) Relative elektrophoretische Beweglichkeit der P22-Hind III-Fragmente auf einem 0,8%igem Gel
Die relative Beweglichkeit der P22-Fragmente wurde gegen ihr bekanntes Molekulargewicht aufgetragen. Die Kurve diente zur Molekulargewichtsbestimmung der Hind III-Fragmente von L und den P22-L-Rekombinanten.
x-x-x P22-Eco RI-Fragmente, o-o-o P22-Hind III-Fragmente

am2 c^L I^{P22} (Spur c)

Dieses Hybrid liefert genau dasselbe Bandenmuster wie der Phage L.

am2 am13 c^L I^{P22} (Spur d)

Das Muster von am2 am13 c^L zeigt Banden mit den Molekulargewichten von P22-Banden B, C und E. Da B das gleiche Molekulargewicht wie Fragment a von L hat, ist hier (noch nicht) zu entscheiden, ob 2·13·L B von P22 oder a von L erhalten hat, oder aber beide Fragmente vorhanden sind, wofür es Anzeichen gibt (siehe 1.2.). Die Bande wird deshalb a_B bezeichnet. Außer diesen Banden ist, wie bereits erwähnt, auch bei diesem Hybrid die D -Bande schwach sichtbar. Da bei L und bei P22 diese Bande zu finden ist, ist nicht zu sagen, von welchem Phagen sie stammt. Von L sind vier Banden zu sehen: d, e, f und g. Zusätzlich ist eine sehr schwache Bande unterhalb von B zu erkennen (a').

am3 c^L I^L (Spur e)

Im Muster dieses Hybrids ist wieder die D -Bande zu erkennen. Diese Bande ist aber deutlich schwächer als bei L und den anderen Rekombinanten. Von L sind die Banden e, f und g vorhanden. Wie bei L scheint eine Bande (dritte von oben) aus zwei Fragmenten zu bestehen - b + c von L. Zusätzlich zu den genannten Banden ist bei 3·L ein Fragment entstanden, das ein Molekulargewicht hat, das keinem Fragment der beiden Elternphagen L und P22 entspricht. Sie wird deshalb mit einem griechischen Buchstaben bezeichnet - α. Direkt darunter ist noch eine schwache und ziemlich diffuse Bande-α' zu finden.

am5 am13 c^L (Spur f)

Dieser Phage zeigt mehrere Banden von P22: C, E und möglicherweise B, falls diese Bande nicht dem Fragment a von L entspricht. Bande D ist bei diesem Hybrid deutlich sichtbar. Von L sind die Banden e, f und g vorhanden. Außerdem gibt es in diesem Muster wie bei 3·L eine

Bande α und ein schwaches α' . Oberhalb von α ist eine weitere schwache Bande zu sehen, die auf unvollständiges Schneiden zurückzuführen ist.

Tab. 26: Molekulargewichte der Eco RI-Fragmente von P22 (nach Jackson 1978 a) 2·13·L, 2·L, 3·L, und Phage L

P22 Eco RI- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$ D)	Phage L Eco RI- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$ D)
A	12,96	a	6,10
A'	10,30	b,c	5,85
B	6,10	c	2,95
C	4,77	D	2,65
D	2,65	e	2,45
E	1,59	f	1,83
F	0,75	g	1,70
G	0,72		
H	0,56		

2·L Eco RI- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$ D)	2·13·L Eco RI Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$ D)
a	6,10	B	6,10
b,c	5,85	a	6,10
d	2,95	c	4,77
D	2,65	d	2,95
e	2,45	D	2,65
f	1,83	e	2,45
g	1,70	f	1,83
		g	1,70
		E	1,59
		α'	5,85

3·L Eco RI- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$ D)	5·13·L Eco RI- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$ D)
α	8,90	α	8,90
α'	8,3-8,8	α'	8,3-8,8
b	5,85	B	6,10
c	5,85	C	4,77
D	2,65	D	2,65
e	2,45	e	2,45
f	1,83	f	1,83
g	1,70	g	1,70
		E	1,59

1.2. Molekulargewichte der DNS der verschiedenen Hybrid-Phagen und L

Die Gelphotos machten es wahrscheinlich, daß die Bande b/c von L und 2·L doppelte Dichte haben, daß diese Bande also aus zwei verschiedenen Fragmenten mit annähernd gleichem Molekulargewicht gebildet wird. Dasselbe scheint für die Banden B (=a) von 2·13·L bzw. b/c von 3·L zu gelten, auch wenn das auf den Photos nicht eindeutig festzustellen war. Addiert man unter Berücksichtigung dieser Doppelbanden die Fragmente so erhält man für alle Phagen ein Molekulargewicht, das dem Wert von P22-DNS ($27,45 \times 10^6$) ähnlich ist (Tab. 27).

Tab. 27: Molekulargewichte der DNS der Hybride und L, die sich aus der Addition der Eco RI-Fragmente ergeben

Phage	Molekulargewichte ($\times 10^6$ D)
P22	27,45
L	26,73
2·13·L	27,49
2·L	26,73
3·L	26,42
5·13·L	27,24

Die Molekulargewichte liegen zwischen $26,73 \times 10^6$ für L, 2·L und 3·L und $27,49 \times 10^6$ D für 2·13·L.

Um Klarheit darüber zu erhalten, ob die angesprochenen Banden tatsächlich zwei Fragmente repräsentieren, wurde DNS von L, 2·L, 2·13·L und 3·L mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten. Hind III, als *Haemophilus influenzae* R (Old et al. 1975) gewonnen, erkennt die Sequenz 5'...AAGCTT...3' und spaltet zwischen AA.

Fig. 29a zeigt die Bandenmuster für P22 (Spur b), L (Spur c) und die Hybrid-Phagen (Spur d bis f). Tab. 28 gibt die Molekulargewichte der Fragmenten an. Als Grundlage zur Molekulargewichtsbestimmung wurden die bereits beschriebenen Werte für die P22-Fragmente hergenommen (Deans, Jackson 1979).

Fig. 29b zeigt die relative elektrophoretische Beweglichkeit der Fragmente in einem 0,8%-igen Gel. Die Fragmente $5,0 \times 10^6$ und $1,2 \times 10^6$ von 3·L, und vermutlich $4,2 \times 10^6$ von 2·13·L und $1,4 \times 10^6$ von L sind jeweils zweimal vertreten. Das Hind III-Bandenmuster zeigt für 2·13·L ein ungewöhnliches Bild. Bande A ist sehr schwach und deutlich diffuser als diese Bande bei P22, L und 2·L ist.

Addiert man die Molekulargewichte der Fragmente für die einzelnen Phagen, erhält man für L, 2·L und 3·L-Werte, die denen der Eco RI-Analyse ähneln, wenn die bei der Eco RI-Analyse fraglichen Banden jeweils aus zwei Fragmenten gebildet werden (Tab. 29). Für 2·13·L war durch Hind III-Analyse kein eindeutiges Bild zu erhalten. Es errechnet sich ein Molekulargewicht von $24,25 \times 10^6$ D, wenn berücksichtigt wird, daß die Banden J, K, L und M von P22 vorhanden sein müssen, auch wenn sie auf dem Gel nicht sichtbar sind.

Da elektronenmikroskopische Messungen für ein Molekulargewicht sprechen, das dem von P22 gleicht (IV.1) ist aber anzunehmen, daß die oberste Bande, die man bei Eco RI-Behandlung erhält, aus zwei Fragmenten gebildet wird,

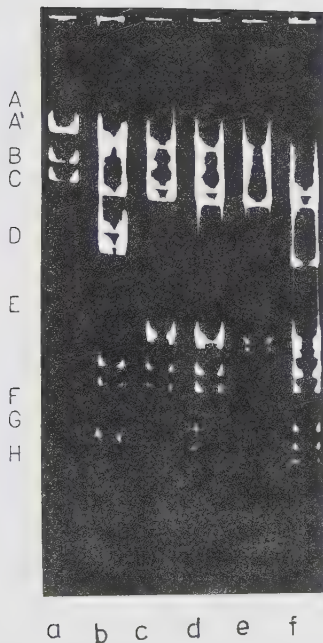


Fig.29a: Bandenmuster der DNS aus reifen Phagen nach Behandlung mit Hind III (bis auf a))
a) P22 nach Behandlung mit Eco RI, b) P22 nach Behandlung mit Hind III, c) L, d) 2 L, e) 2 13-L, f) 3-L

Tab. 28: Molekulargewichte der Hind III-Fragmente von P22(Deans,Jackson 1978) 2·13·L, 2·L 3·L, 5·13·L und Phage L

a. P22 Hind III- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$)	b. L Hind III- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$)
A	10,3		10,3
B	4,2		5,0
C	2,8		4,2
D	2,6		1,4
E	2,4		1,4
F	1,2		1,38
G	1,0		1,2
H	0,65		1,0
I	0,5		0,7
J	0,33		0,64
K	0,23		0,62
L	0,2		0,5
M	0,2		
c. 2·L Hind III- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$)	d. 2·13·L Hind III- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$)
	10,3	A	10,3
	5,0	B	4,2 doppelt
	4,2		1,4
	1,4		1,38
	1,4		0,7
	1,38		0,64
	1,2	I	0,5
	1,0	J	0,33
	0,7	K	0,23
	0,64	L	0,2
	0,62	M	0,2
	0,5		

e. 3·L Hind III- Fragmente	Molekular- gewichte ($\times 10^6$)
	5,0
	5,0
	4,2
	2,4
	1,4
	1,38
	1,28
	1,2
	1,2
	1,0
	0,7
	0,84
	0,63
	0,62
	0,5

Tab. 29: Molekulargewichte der DNS der Hybride und L, die sich aus der Addition der Hind III-Fragmente ergeben

Phage	Molekulargewicht ($\times 10^6$ D)
P22	26,61
L	28,34
2·13·L	24,28
2·L	28,34
3·L	26,15

wodurch sich ein Molekulargewicht von $27,49 \times 10^6$ ergibt. Ein weiterer Hinweis darauf, daß dieses Molekulargewicht zutrifft, ist der Versuch, bei dem reife 2·13·L-DNS in P22-proheads verpackt wurde und die Dichte der entstandenen in vitro-Partikel bestimmt wurde (V.2). Sie hatten P22-Dichte, was dafür spricht, daß ihre DNS das Molekulargewicht der DNS von P22 hat.

Um die Unklarheit zu beseitigen, wurden präparative Gele von P22 und 2·13·L, die jeweils mit Eco RI geschnitten waren, hergestellt, aus diesen jeweils die Bande B bzw. B, a (= "B") eluiert und a mit Hind III bzw. b mit Sal I, eine Restriktionsnuklease isoliert aus *Streptomyces albus* G (Arrand et al. 1978) nachgeschnitten.

Das B-Fragment von P22 hat keine Schnittstelle für Hind III bleibt also intakt (Deans, Jackson 1979). Wird die Bande "B" von 2 13 L nur aus Fragment B gebildet, sollte auch hier nach Hind III-Behandlung keine weiteren Banden auf-

treten. Sind dagegen neben B noch eine oder mehrere andere, zu finden, bedeutet das, daß die Bande "B" aus zwei Fragmenten besteht, nämlich der tatsächlichen Bande B und einer weiteren mit ähnlichem Molekulargewicht. Ähnliches gilt für die Behandlung mit Sal I. Das B-Fragment von P22 wird durch Sal I in zwei Fragmente gespalten (Chisholm et al. 1980). Vergleicht man das Muster der B-Bande von P22 mit dem Muster, das man bei Behandlung der "B"-Bande von 2·13·L mit Sal I erhält, kann man entscheiden, ob dieses "B" aus einem oder zwei Fragmenten besteht.

Fig.30 zeigt das Ergebnis:

Spur a zeigt das Eco RI-Schnittmuster von P22-DNS, Spur b das isolierte B-Fragment von P22, Spur c das isolierte "B"-Fragment von 2·13·L. Spur d und e gibt die Bilder für Hind III-Behandlung wieder:

d. P22-B-Bande

e. 2·13·L "B"-Bande

Man erkennt deutlich den Unterschied: in d ist nur die intakte B-Bande zu finden, in Spur e sind 4 Banden zu erkennen, das intakte B und drei weitere Banden mit kleinerem Molekulargewicht ($4,35$, $1,3$ und $0,62 \times 10^6$). Zusammen ergeben die drei kleineren Banden in etwa das Molekulargewicht des B-Fragments, nämlich $6,3 \times 10^6$ D. Die "B"-Bande von 2·13·L besteht also aus dem B-Fragment von P22 und einem weiteren Fragment derselben Größe, wahrscheinlich a von L (Eco RI-Verdau, siehe S. 131, 134). Ob es tatsächlich a ist, wurde nicht geprüft, da Bande a vom Phagen L sehr dicht bei Bande b, c liegt (siehe Fig. 28) und schlecht im präparativen Gel abzutrennen ist.

Spur f und g zeigen das Bild für die Auftrennung der Fragmente nach Behandlung mit Sal I:

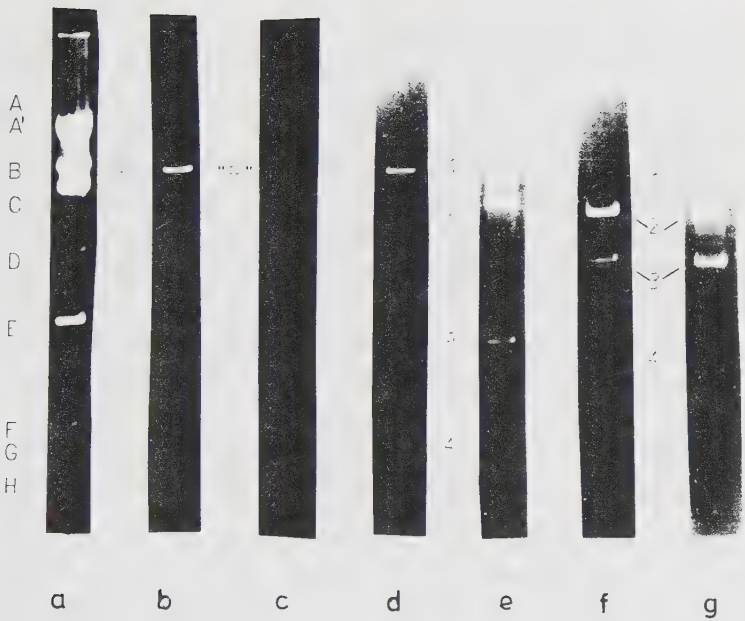


Fig.30: Restriktionsanalyse der Bande B von P22 und "B" (3a,B) von 2·13·L mit Hind III und Sal I nach Isolierung der jeweiligen Bande aus einem Präparativen Agarosegel. a) P22 -Eco RI, b) B von P22, ungeschnitten, c) "B" von 2·13·L, ungeschnitten, d) B , mit Hind III behandelt, e) "B",Hind III-behandelt, f) B nach Sal I-Behandlung, g) "B" nach Sal I-Behandlung.

f. P22-B-Bande

g. 2 · 13 · L - "B"-Bande

In Spur f sieht man die von Chisholm et al. (1980) bereits beschriebenen zwei Fragmente, die aus dem B-Fragment entstehen.

In Spur g sind vier Banden zu sehen, davon gleichen zwei denen, die aus dem B-Fragment von P22 gebildet werden. Die übrigen Banden haben Molekulargewichte von $5,25 \times 10^6$ und $1,10 \times 10^6$ D. Gemeinsam ergibt das $6,35 \times 10^6$ D, also fast das Molekulargewicht von B, das $6,1 \times 10^6$ D beträgt.

"B" von 2 · 13 · L wird also eindeutig aus zwei Fragmenten, von denen das eine B von P22 ist, gebildet.

1.3. Molarer Anteil einiger der Eco RI-Fragmente von L und den Hybriden

Die Bandenmuster von L und den Hybriden zeigen einige Anomalien (Fig. 28 b bis f). Die D-Banden scheinen z. T., wie erwähnt außer bei 5·13·L, erheblich schwächer zu sein als bei P22, Außerdem lassen densitometrische Messungen von Photos der Bandenmuster annehmen (Fig. 31 a und b), daß Bande e bei L und Hybriden stärker ist als zu erwarten. Banded von L und 2·13·L scheinen schwächer zu sein. Weder die Gelphotos noch die Densitogrammbilder erlauben allerdings eine eindeutige Entscheidung, ob e überrepräsentiert, d aber unterrepräsentiert ist oder aber nur e überrepräsentiert bzw. nur d schwächer ist.

Diese Schwierigkeit war auch nicht ganz auszuräumen, als ich die jeweiligen Konzentrationen der fraglichen Banden mit Hilfe der Kurven zu bestimmen versuchte. Hierzu er-

rechnete ich die Fläche unter den peaks dieser Fragmente und setzte sie ins Verhältnis zu einem "theoretischen" 100%-Wert. Dieser wurde ermittelt, indem Banden, die offensichtlich in normaler Konzentration auftreten, unter Berücksichtigung der Molekulargewichte als Bezugsbanden verwendet wurden. Die Fläche, die der peak der gewählten Bezugsbande umfaßt, wurde gleich 100% für das Molekulargewicht des Fragments gesetzt und berechnet, wie groß der peak sein müßte, wenn das Molekulargewicht der jeweiligen fraglichen Bande zugrunde gelegt wird (= "theoretischer" 100%-Wert) und der tatsächliche %-Anteil berechnet. Die so erhaltenen Werte sind in Tab. 30 zusammengefaßt. In den Spalten a und b wurden verschiedene Fragmentanteile Bezugswerte zugrundegelegt:

in Spalte a) Bande f bzw. bei P22 F,
in Spalte b) Bande g für L und 3·L, Bande C für 2·13·L und 5·13·L, für 2·L Bande d, und für P22 Bande H und zusätzlich noch die E-Bande und der Mittelwert der erhaltenen Werte gebildet. Die letzte Spalte gibt die Mittelwerte von a) und b) an. Nur für 3·L und 5·13·L sind die Werte unter a) und b) fast gleich, bei den anderen Phagen unterscheiden sie sich z. T. erheblich. Für 2·L erhält man nur bei den Berechnungen bezogen auf die d-Bande vernünftige Zahlen, bezogen auf f dagegen stimmen die Zahlen sicher nicht mit der Gel-Abbildung überein. Die Kurven sind offenbar sehr ungenau und die absoluten Werte dürften kaum stimmen. Eine Aussage läßt sich aber doch machen. "D" scheint bei den Hybriden und L in geringerer Konzentration vorhanden zu sein als bei P22, für den ein Anteil von 72% ermittelt wurde. Es ergaben sich Anteile zwischen 47% bei L und 2·L und nur 12% für 3·L. Der Wert für P22 weicht ziemlich von dem von Jackson angegebenen ab -32% (Jackson et al. 1979b). Der Unterschied ist vermutlich bedingt durch die Ungenauigkeit meiner Messungen.

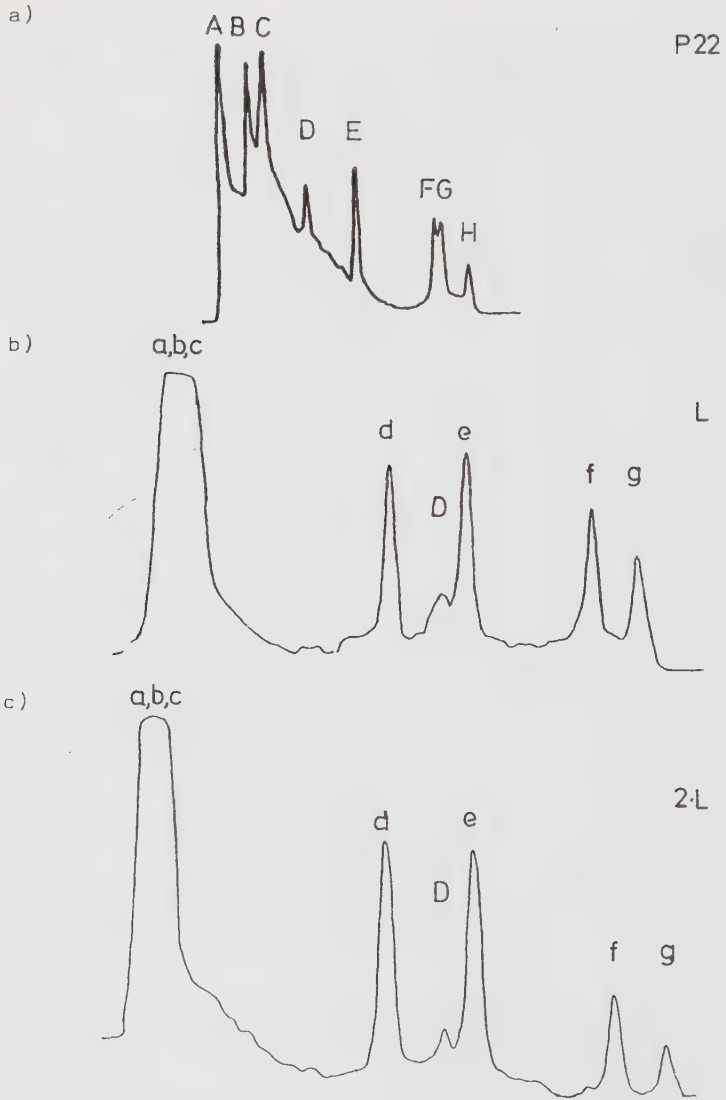
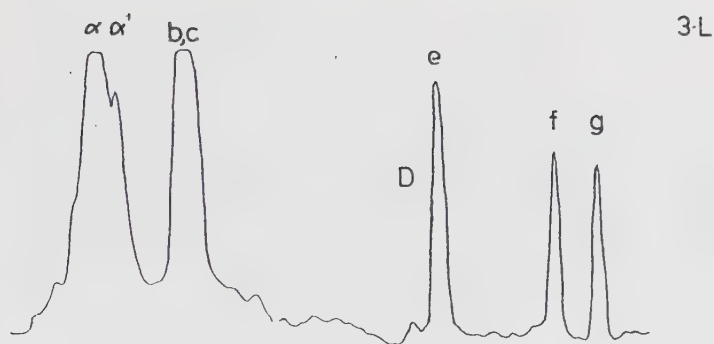


Fig.31: Densitogramme der Abbildungen der Bandenmuster von reifer DNS nach Eco RI-Behandlung
a) P22, b) L, c) 2·L, d) 3·L, e) 2·13·L, f) 5·13·L

d)



e)



f)

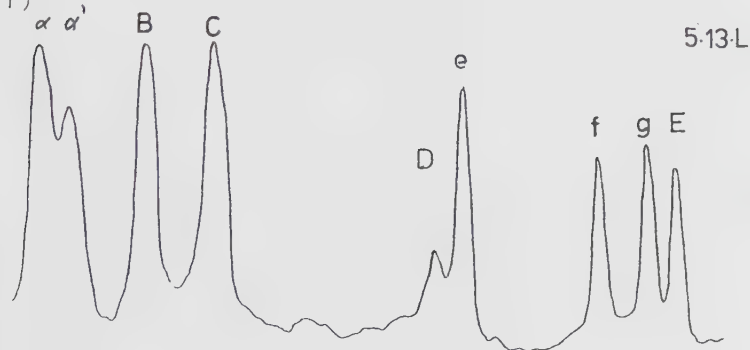


Fig.31

Tab. 30: Molarer Anteil der über- und unterrepräsentierten Eco RI-Fragmente von P22, Phage L, 2·L, 2·13·L, 3·L und 5·13·L

Die Menge der DNS in den Banden wurde durch densitometrische Messungen der Bandenabbildungen auf vergrößerten Photos bestimmt und der prozentuale Anteil berechnet (siehe Text).

a. in Bezug zu Fragment f bzw. F für P22

b. in Bezug zu Fragment g für L und 3·L

c für 2·13·L und 5·13·L

d für 2·L

H und E (Mittelwert) für P22

Phage	Fragment	Molekular- gewicht	prozentualer Anteil		Mittel- wert
			%		
			D	a	
P22	D	2,65	59	78	72
L	D	2,65	56	49	47,5
	d	2,95	72	86	79
	e	2,45	120	113	117
2·L	D	2,65	59	35	47
	d	2,95	(168)		
	e	2,45	(200)	119	119
2·13·L	D	2,65	21	30	25,5
	d	2,95	58	73	65,5
	e	2,45	104	134	119
3·L	D	2,65	12	12	12
	e	2,45	125	124	124,5
5·13·L	D	2,65	54	54	54
	e	2,45	108	109	108,5

Bande e ist bei L, $2 \cdot L$, $2 \cdot 13 \cdot L$ und $3 \cdot L$ überrepräsentiert. Es ergaben sich für alle ein Wert um 120%. Möglicherweise gilt die Feststellung auch für $5 \cdot 13 \cdot L$. Bei ihm wurde ein Wert von 110% errechnet. Bande d ist bei L und $2 \cdot 13 \cdot L$ unterrepräsentiert (etwa 70%). Für $2 \cdot L$ ist das nicht zu klären, da wie erwähnt die Bande f nicht als Bezugswert herzunehmen ist. In Spalte b wurde aber gerade $d=100\%$ gesetzt, da keine weiteren Banden als Berechnungsgrundlage zur Verfügung stehen.

2. Analyse der DNS aus Infektionen von end^- bzw. LT2-Zellen mit am-Mutanten mit der Restriktionsnuklease Eco RI

Durch Untersuchung der DNS aus end^- -Zellen, die mit den verschiedenen am-L-Hybriden infiziert waren, läßt sich klären, ob sich die Anomalien, die die Bandenmuster der Hybride zeigen, aus dem Verpackungsmodus ergeben. Wenn ja, sollten sie bei nicht verpackter DNS aus end^- -Infektionen nicht zu finden sein.

Außerdem läßt sich mit dieser Methode die Frage beantworten, ob der erste Schnitt an der pac-Sequenz unabhängig davon erfolgt, ob DNS verpackt wird oder nicht. Wenn dies zutrifft, sollte DNS aus Infektionen von LT2 mit P22-amMutanten in den Verpackungs- und Kopfgenen nach Behandlung mit Eco RI die D-Bande liefern. Denkbar wäre auch, daß proheads für den pac-Schnitt notwendig sind. Die D-Bande dürfte dann nicht in Infektionen mit am5 und am8 auftauchen, möglicherweise auch nicht mit am1, da hier nur defekte proheads gebildet werden. DNS, die aus infizierten end^- -bzw. LT2-Zellen gewonnen worden war, wurde einer Eco RI-Behandlung unterworfen und die Fragmente auf Agarosegelen durch Elektrophorese getrennt.

2.1. P22-L-Hybride

Fig. 32 zeigt die Ergebnisse für Extrakt-DNS, die nach Infektion von end⁻ mit Hybrid-Phagen bzw. P22 (H5) gewonnen wurde (a-c). Spur d zeigt zum Vergleich das Bild einer H5-Präparation nach Eco RI-Behandlung. Die Phagenbanden sind deutlich zu erkennen. Bakterielle DNS ist nur schwach zu sehen, da sie in sehr viele dünne Banden zerlegt wird. Den Bandenmustern der Phagen fehlt in jedem Fall die "D"-Bande. Der pac-Schnitt erfolgt offenbar weder bei einer Mutante in Gen 2 noch in Gen 3, zumindest bei diesen Mutanten, die jeweils noch einen Anteil L-DNS haben. Auch die Banden α' (3·L) und α' (2·13·L) scheinen zu fehlen. Außerdem sind keine Banden zu finden, die unnormal stark bzw. schwach gefärbt sind: bei 2·13·L und 2·L ist d eindeutig stärker sichtbar als e im Unterschied zur Eco RI-Analyse der reifen DNS. Die Densitogramme der Gelphotos bestätigen dies (Fig. 33). Der peak für d ist deutlich höher als der e-peak. An der Position von D ist kein peak zu erkennen. Die ungewöhnlichen Stärken der Banden und das Auftreten von D und α' bzw. α' scheinen also durch den Verpackungsprozess bedingt zu sein.

2.2. P22-am-Mutanten

In derselben Weise wie die L-P22-Rekombinanten wurden am-Mutanten von P22 untersucht. Mutanten in den Kopfgenen 5 und 8 und in den Verpackungsgenen 1, 2 und 3 wurden in LT2 (Wildtyp) gezogen, die DNS der infizierten und nicht infizierten Zellen isoliert und mit Eco RI behandelt. Fig. 34 zeigt die Bandenmuster, die ich erhielt. Spur a enthielt DNS aus nicht infizierten Zellen Spur g DNS von reifen H5-Phagen. Dazwischen sind die verschiedenen Mutanten zu sehen. Bei H5 sind deutlich Bande A', und Bande D zu erkennen, von denen D durch einen

pac-Schnitt und einen Eco-Schnitt begrenzt wird, sowie A' durch den Endschnitt und einen Eco-Schnitt. Die Muster der Mutanten lassen schwache bakterielle Banden erkennen, erheblich deutlicher sind die Phagenbanden zu sehen, bis auf F, G und H, die im unteren Bereich des Gels laufen und von abgebauter DNS und der RNS verdeckt werden. A' ist bei keiner der Mutanten zu finden. Da sich im Bereich von D auch eine bakterielle Bande befinden soll (Jackson, persönl. Mitteilung), ist nicht zu entscheiden, ob die bei allen Mutanten schwach sichtbare Bande in Höhe von D aus Phagen- oder Bakterien-DNS besteht. Sollte jedoch dennoch eine D-Bande vorhanden sein, so ließe sich deren Auftreten trotz Fehlen der A'-Bande nur auf folgende Weise erklären: Zur Veranschaulichung soll Fig. 35 dienen, die ein spiralförmig um das Genom gezeichnete P22-Konkatemer zeigt, in das alle Eco RI-Schnittstellen und die pac-site angegeben ist. Das Konkatemer beginnt hier am origin of replication (ori). Erfolgt ein Schnitt nur an der ersten pac-Sequenz auf einem Konkatemer (der nächsten zum ori) entsteht zwar bei Verdau mit Eco RI ein D aber kein A'. Ein Schnitt an allen weiteren pac-Sequenzen würde dagegen außer einem D eine Bande mit dem Molekulargewicht von A' liefern. Falls also bei den Mutanten zwar kein A' gebildet wird, dennoch aber eine D-Bande zu finden wäre wäre dies damit zu erklären, daß auf den Konkatemeren nur die erste pac-Sequenz geschnitten wird, die folgenden nicht. Eine Entscheidung, darüber ob die im D-Bereich erkennbare Bande von bakterieller DNS herrührt oder vom Phagen ließe sich über den Versuch einer Hybridisierung der Bande mit Phagen DNS herbeiführen. Dieser Test wurde nicht durchgeführt.

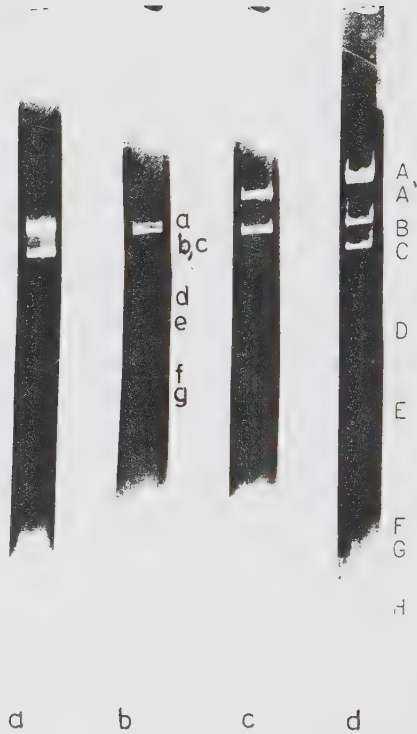


Fig.32: Bandenmuster der DNS aus Infektionen von end^- -Zellen mit a) 2·13·L, b) 2·L, c) 3·L, d) P22 (reife DNS) nach Eco RI-Behandlung.

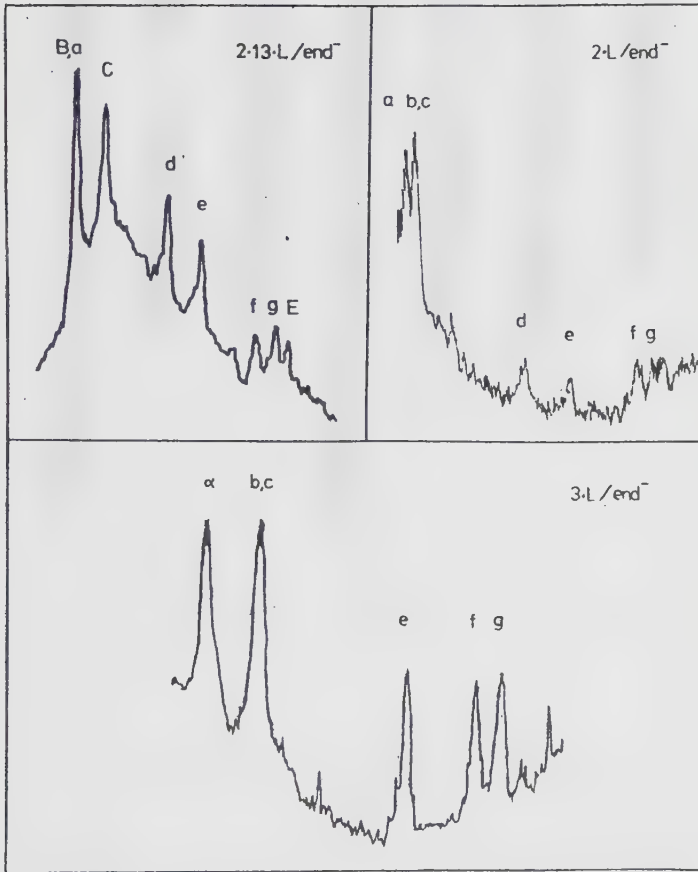


Fig.33: Densitogramme der Abbildungen der Bandenmuster von DNS aus Infektionen von *end* mit
a) 2·13·L, b) 2·L, c) 3·L, nach Eco RI-Behandlung.



Fig.34: Bandenmuster von DNS aus Infektionen von end^- -Zellen nach Eco RI-Behandlung : a) nicht infizierte Zellen b) am1 am13, c) am2 am13, d) am3, e) am5 am13, f) am8 am13, g) P22 (reife DNS)

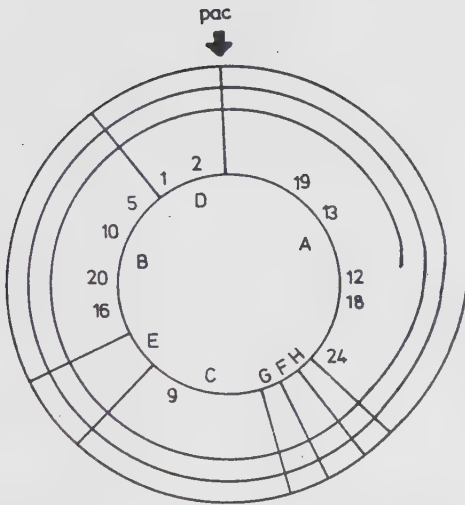


Fig.35: Genom von P22, um das spiralförmig ein Konkatermer gezeichnet ist. Eingezeichnet sind alle Eco RI-Schnittstellen (durchgezogene Linien) und die pac-site (➡)

3. Anteile von P22 und L in den Hybriden

Die bei der Untersuchung des Verpackungsmodus der P22-L-Hybride und des Phagen L durch Restriktionsanalyse mit Eco RI gewonnene Informationen erlauben zusätzlich eine genauere Charakterisierung der verschiedenen Phagen. Anhand der Analyse mit Eco RI kann in etwa abgeschätzt werden, welche Anteile der Hybrid-DNS von L, welche von P22 stammen. Bekannt ist jeweils der am-Marker von P22 und die Immunität (siehe Teil I und II). Tab. 31 faßt zusammen, was für die einzelnen Phagen an genetischen Daten bekannt ist.

Fig. 35 zeigt die Folge der Eco RI-Fragmente im Chromosom der Elternphagen P22 und L und der verschiedenen Rekombinanten. Diese "Karten" entstanden auf Grund folgender Überlegungen:

P22 (a)

Bei Verdau mit Eco RI entstehen aus der P22-DNS einschließlich D 8 Fragmente. Die Zuordnung zur Genkarte führte Jackson durch (Jackson et al. (a)). Die Reihenfolge der Fragmente beginnend mit der Schnittstelle 1 links von D(pac) lautet: B, E, C, G, F, H, A (mit D). Die Kopfgene 8 und 5 liegen auf B, Gene 1, 2, 3 und 13 auf A, wo auch die c-Immunität liegt. Das Fragment E besteht fast vollständig aus der I-Region.

am5 am13 c^L I^{P22} (b)

Die Gene 5 und 13 und die I-Immunität stammen von P22, die c-Region war von L eingekreuzt worden (Tab. 31). An Eco RI-Fragmenten von P22 sind E und C vorhanden, außerdem ein Fragment mit dem Molekulargewicht von B, was dem a-Fragment von L im Molekulargewicht gleicht. Da Gen 5 bei P22 neben Schnittstelle 1 auf B liegt, und das Hybrid auch die Fragmente E und C hat, kann man mit gutem Grund annehmen, daß das fragliche Fragment B und nicht a ist. Die Schnittstellen 1, 2, 3 und 4 von P22 sind also hier zu finden. So ist zu

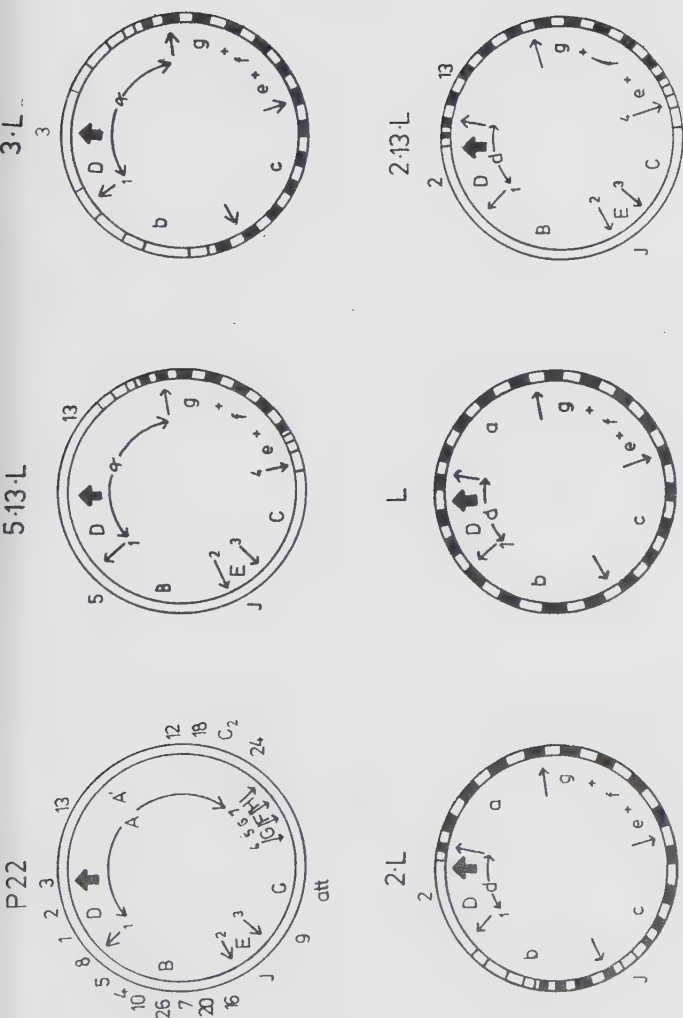


Fig. 36: Reihenfolge der Fragmente und Zuordnung der Anteile von P22 und L in den Hybriden, eingezeichnet sind alle Eco RI-Schnittstellen (—→) und die pac-site (—→), P22-Anteil, L-Anteil, DNS sein

Tab. 31: Anteile von P22 und L-DNS in den Hybriden auf Grund genetischer Daten

Phage	Region von L	Region von P22
P22		alle Gene
L	alle Gene	
2•L	c	Gen 2, I-Region
2•13•L	c	Gen 2, Gen 13, I
3•L	c, I	Gen 3
5•13•L	c	Gen 5, Gen 13, I

vermuten, daß diese Fragmente den Bereich der c-Immunität umgeben, die allen Rekombinanten gemeinsam ist. Welche Reihenfolge sie haben, ist nicht anzugeben. Sie liegen demnach rechts von der Schnittstelle 4 (P22) und schließen offenbar direkt daran an, da bei 5•13•L nur noch ein weiteres Fragment, nämlich α zu entdecken ist. Auf α muß pac und Gen 13 liegen. Es schließt an e, f und g an und besteht aus P22-DNS (mindestens einschließlich Gen 13) und L-DNS, da eine L-Schnittstelle das eine Ende des Fragments bildet. Reihenfolge der Fragmente gegen den Uhrzeigersinn: B, E, C, (e, f + g), α mit pac.

am3 c^L I^L (c)

Tab. 31 faßt die bekannten genetischen Daten des Hybrids zusammen: Gen 3 stammt von P22, beide Immunitätsregionen von L. Bei Eco RI-Behandlung entstehen neben den bereits erwähnten L-Fragmenten e, f und g die Fragmente b und c von L. Außerdem ist α , (sowie dessen Teilfragment α' - siehe Diskussion) das auch bei 5•13•L zu finden ist, vorhanden. Man kann wohl annehmen, daß dieses α auch bei 3•L neben der auch hiervorhandenen Schnittstelle 1 liegt. Auf diesem Fragment liegen Gen 3 und pac, so daß D aus P22-DNS bestehen muß (Schnittstelle 1 bildet das eine Ende, pac das andere). Bei 5•13•L wurde gezeigt, daß e, f + g direkt an α anschließen. Es bleiben noch zwei

Fragmente, nämlich b und c, die beide etwa dasselbe Molekulargewicht haben. Sie müssen zwischen Schnittstelle 1 und e, f und g liegen. Wie weit der P22-Anteil auf dem b-Fragment reicht, ist nicht zu klären. Schnittstelle 1 muß den Phagen P22 und L gemeinsam sein, da b auch bei L zu finden ist und D ebenfalls für beide identisch ist. Die Reihenfolge von Schnittstelle 1 aus lautet dann gegen den Uhrzeigersinn: b, c, e + f + g, (mit pac)(da b und c nicht weiter identifiziert wurden, wurde ihre Reihenfolge analog zu P22 festgelegt).

Bei der vorgenommenen Kartierung der Fragmente bleibt eine Ungenauigkeit: Ein Schnitt bei pac läßt außer einem D-Fragment ein zweites Fragment entstehen, das den anderen Teil des gesamten Fragments darstellt (bei P22: $A = A' + D$). Ein solches Fragment müßte gemäß der oben angegebenen Reihenfolge der Fragmente und Lage der pac-Sequenz auf α bei $5 \cdot 13 \cdot L$ und bei $3 \cdot L$ ein Molekulargewicht von $6,25 \times 10^6$ D ($\alpha - D = 8,9 - 2,65 = 6,25$) haben. Bei $5 \cdot 13 \cdot L$ ist es wahrscheinlich, daß eine schwache Bande dieser Größe von der Bande B mit dem Molekulargewicht $6,10 \times 10^6$ D überlagert ist. Bei $3 \cdot L$ müßte sie eigentlich etwas oberhalb von Bande b+c ($5,85 \times 10^6$ D) sichtbar sein, ist aber nicht. Diese ist aber ziemlich unscharf und breit, so daß möglicherweise dahinter eine schwache Bande vom Molekulargewicht $6,25 \times 10^6$ D verschwindet. Die schwache Bande α' kann dieses Fragment nicht sein, da sie ein Molekulargewicht zwischen 8,8 und $8,3 \times 10^6$ D hat, also deutlich größer ist.

am2 c^L I^{P22} (d)

Gen 2 und die I-Immunität hat das Hybrid von P22 erhalten, die c-Region von L (Tab. 31). Das Bandenmuster von $2 \cdot L$ gleicht dem von L vollständig: man findet die Banden a bis g und ein D. Die Anordnung von b, c, e + f + g ist bereits durch die vorher beschriebenen Hybride festgelegt. Es bleibt nur noch ein Sektor, der zwischen

Schnittstelle 1 und e+f+g liegt. So kommt für die Lage von a und d nur dieser Bereich in Frage. Die beiden Fragmente a und d von 2·L haben zusammen ein ähnliches Molekulargewicht wie α , nämlich $9,05 \times 10^6$ D ($2,95 + 6,10 \times 10^6$ D). α von 3·L und 5·13·L liegt ebenfalls zwischen Schnittstelle 1 und e+f+g. Gen 2 liegt bei P22 auf D. Pac liegt rechts davon. So ist anzunehmen, daß auch dieses Hybrid D von P22 erhalten hat. Wenn man annimmt, daß sich pac auf a befindet, ergibt sich folgende Ungeheimtheit: Ein Schnitt bei pac läßt nicht nur ein D-Fragment entstehen, sondern außerdem ein weiteres Fragment, das aus dem anderen Teil des ursprünglichen Fragments besteht (bei P22: $A = A' + D$). Ein solches Fragment müßte, wenn pac auf a läge, ein Molekulargewicht von $3,45 \times 10^6$ D ($a - D = 6,10 - 2,65 = 3,45$) haben, und müßte als schwache Bande zwischen b, c und d sichtbar sein. Eine solche Bande ist aber nicht zu finden. Die pac-Sequenz müßte also auf d liegen: Beim Schnitt an pac entsteht dann außer D ein Fragment von nur $0,3 \times 10^6$ D ($2,95 - 2,65$). Eine schwache Bande in dieser Größe ist auf den Gelen nicht erkennbar, bzw. wäre dies nur bei sehr starkem Überladen der Gelspur.

Die Schnittstelle 1 zwischen b und c stammt von L. Aus genetischen Daten ist aber bekannt, daß die I-Region von P22 sein muß. Sie muß auf Fragment b oder c liegen und von L-DNS flankiert sein. Da aber auch Gen 2 von P22 stammt, muß diese L-P22-Rekombinante durch zweifachen Stückaustausch entstanden sein. Die Folge der Fragmente von Schnittstelle 1 heißt zusammengefaßt: b, c, e+f+g, a, d mit pac.

L (e)

Fig. 36e zeigt die Fragmentreihenfolge für L, die der von 2·L gleicht. Die Folge der Fragmente e, f und g kann nicht angegeben werden, da diese Fragmente bei allen Rekombinanten zu finden sind. Eine genetische Zuordnung

ist natürlich auch nicht möglich, da keine Mutanten von L in den entsprechenden Regionen bekannt sind. Wie alle Hybride, die das D-Fragment von P22 erhalten haben, hat auch L eine D-Bande, die offenbar durch einen Eco RI-Schnitt und einem pac-Schnitt entstanden ist. Die pac-Sequenz sollte, wie bei 2·L, auf dem Fragment d liegen. Dies macht folgendes wahrscheinlich: e, f und g sind kleiner als D (zwischen $2,45$ und $1,7 \times 10^6$ D), können also deswegen kein D liefern, b und c müßten je ein Fragment mit einem Molekulargewicht von $3,2 \times 10^6$ D ($5,85 - 2,65 = 3,20$) außer D entstehen lassen. Eine solche Bande ist aber im Gel nicht erkennbar. Läge pac auf a, entstünde wie oben beschrieben, ein Fragment der Größe $3,45 \times 10^6$ D, was auch nicht zu finden ist. Pac sollte also auch bei L rechts neben der Schnittstelle 1, die P22 und L gemeinsam ist, auf dem Fragment d liegen.

am2 am13 c^L I^{P22} (f)

f zeigt die Fragmentfolge für 2·13·L. 2·13·L hat die P22-Fragmente B, C, E und außerdem die L-Fragmente d, e, f und g und, wie in VI.1.2 gezeigt, Bande a von L. a und d liegen, wie bereits bei 2·L verdeutlicht, zwischen Fragment B und e, f+g. Wie bei L und 2·L abgeleitet, muß die Reihenfolge der L-Banden im Uhrzeigersinn heißen: d, a, e+f+g. d liegt also neben Schnittstelle 1 bzw. Fragment B. Das Hybrid hat die Gene 2, 13 und Imm I von P22 (Tab. 31), d. h. daß der Bereich rechts von Fragment B bis einschließlich Gen 13 aus P22-Anteil bestehen sollte. Das würde aber einen größeren Anteil als Fragment d insgesamt überhaupt umfaßt ausmachen. Fragment d wird durch eine L-Schnittstelle begrenzt. Erklärbar ist diese Ungereimtheit vermutlich folgendermaßen: die Mutante die als 2·13·L isoliert wurde, zeigte bei späterer Überprüfung, daß sie inzwischen vorwiegend aus 13⁺-Phagen bestand. Es erscheint daher als wahrscheinlich, daß ursprünglich von einem Mischlysat ausgegangen worden war, in dem sich nach mehrmaliger Vermehrung eine Mutante 2·L anreicherte, die DNS also aus solch einer Mutante stammt.

Im folgenden werde ich sie aber weiter 2·13·L nennen, um Verwechslung mit der als 2·L isolierten Mutante zu verhindern.

4. Zusammenfassung

Die Anteile von P22- und L-DNS in den P22-L-Hybriden wurde durch Analyse mit den Restriktionsnukleasen Eco RI, Hind III und Sal I bestimmt. Alle Hybride haben die pac-Sequenz von P22 erhalten und liefern die D-Bande im Eco-RI-Bandenmuster, wenn auch in geringerer Menge als P22. Auch durch Verdau von L-DNS mit Eco RI entsteht eine unterrepräsentierte Bande mit demselben Molekulargewicht. Weitere unterrepräsentierte und überrepräsentierte Banden, die bei den P22-L-Hybriden im Eco RI-Bandenmuster festzustellen sind, scheinen im Zusammenhang mit dem Verpackungsprozess zu stehen. Die Molekulargewichte aller Hybride und vom Phagen L gleichen dem von P22.

Ob der pac-Schnitt auf einem Konkatemer bei Infektion von Wildtypzellen mit am-Mutanten in verschiedenen Reifungsstadien (1, 2, 3, 5, 8) erfolgt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Man findet schwache Banden im Bereich von D bei Verdau mit Eco RI, die aber auch von den Bakterien stammen können. Bande A' ist nicht erkennbar. Bei den verschiedenen Mutanten zeigt sich keine Unterschiede.

D. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein experimenteller Ansatz entwickelt, um P22-DNS in vitro in proheads zu verpacken. Alle notwendigen Enzyme und Vorläuferstrukturen werden von zwei verschiedenen mit amber-Mutanten infizierten Zellextrakten geliefert, die DNS wird in gereinigter Form zugegeben. Das System leitet sich von einem Verpackungsansatz für λ -DNS von Kaiser und Masuda (1973) ab. Botstein et al. hatten bereits 1973 späte assembly-Schritte bei P22 auf diese Weise untersucht. Frühe Schritte wie Verpackung von DNS, waren aber in vitro nicht möglich, wie auch bis vor kurzem für keinen anderen Phagen mit terminal redundanter DNS ein Versuchs-System beschrieben war, um den DNS Verpackungsablauf in vitro zu untersuchen.

System zur Verpackung von DNS in vitro:

Verpackung von DNS in einem Ansatz, in dem einer der Extrakte als DNS-Donor wirkte, war nicht nachzuweisen, da die Leakiness der Mutanten dazu führte, daß die Extrakte bereits hohe Titer von Phagen (background-Phagen) aufwiesen (Tab. 4-6). Dieser Titer war auch mit verschiedenen Methoden, wie Präadsorption der freien Phagen oder Inaktivierung durch UV-Bestrahlung nicht zu senken (Tab. 6-9). Nur bei sehr effektiven Komplementationsprozessen, wie dem self-assembly von Kopf und Schwanz (Tab. 1, 4) und der Stabilisierung DNS-gefüllter Köpfe mit gp10 und gp26 (Tab. 5) lag der Titer nach dem Mischen von zwei entsprechenden Extrakten über dem der einzelnen Extrakte. Um diffizilere, in vitro nicht so effektiv ablaufende Schritte in der P22-Reifung, wie die Verpackung von DNS zu untersuchen, muß gereinigte DNS mit genetischer Markierung als Substrat zu einem Extraktgemisch zugegeben werden. Die extrakteigene DNS

wird zerstört, um Konkurrenz mit der exogenen DNS zu verhindern.

Um die *in vitro*-Phagen vor dem Hintergrund der Phagen aus dem Extrakt nachweisen zu können, wurde für die DNS-Isolierung ein Hybrid aus P22 und dem Phagen L, am2 am13 c^L I^{P22}, gekreuzt. Durch die Immunität von L lassen sich Partikel mit diesem Genotyp auf dem Indikatorstamm Su70(sie) vermehren, auf dem die background-Phagen der Extrakte nicht wachsen können (Tab. 10). Da *in vivo* DNS-Konkatemere direkte Vorläufer der reifen DNS in den Phagenköpfen sind, wurde die zu verpackende DNS aus nicht supprimierenden Zellen, end⁻, die mit am2 am13 c^L I^{P22} infiziert und 40 Minuten inkubiert wurden, gewonnen. Durch Phenolextraktion konnten DNS-Moleküle isoliert werden, die 1x bis 3x so lang waren wie ein normales P22-Chromosom, was sich in Messungen von elektronenoptischen Aufnahmen solcher Präparationen zeigte (Fig. 19, 20; Tab. 23). Moleküle von zehnfacher Phagenchromosomenlänge, wie sie von Botstein (1968) als DNS-Vorläuferstruktur beschrieben werden, konnten nicht gefunden werden. Da Botstein nur die Länge der DNS bestimmen wollte, konnte er den Zellaufschluß direkt auf die Gradienten geben und kam ohne Reinigungsschritte aus, was bei meinem Ziel, nämlich die DNS *in vitro* zu verpacken, unerlässlich war. Gab ich DNS-Präparationen nach radioaktiver Markierung direkt auf lineare Sucrosegredienten und bestimmte die Länge der Moleküle, konnte ich Phagen-DNS in der von Botstein beschriebenen Länge erhalten, auch wenn diese nur einen sehr kleinen Anteil der gesamten DNS ausmachte (Fig. 6).

Das Reifen der Phagenpartikel *in vitro* erfordert die Zugabe von ATP, Spermidin und Mg-Ionen. Die Optima für ATP und Spermidin gleichen denen, die von Kaiser und Masuda (1973) für λ beschrieben wurden (Fig. 12, 14).

Welche Rolle die beiden Stoffe bei den einzelnen Verpackungs- und Reifungsschritten spielen, ist nicht genau bekannt. Spermidin ist möglicherweise für die Kondensation der DNS in den engen Hohlraum des Kopfes mitverantwortlich, da Spermidin als basisches Protein die Säuregruppen der DNS neutralisiert und dadurch die Abstoßungskräfte beim Kondensieren der DNS reduziert bzw. überwindet (Cohen, Cormick 1979). ATP-Hydrolyse liefert vermutlich die Energie, um den offenbar energetisch ungünstigen Prozess der DNS-Verpackung zu erlauben.

Die Magnesiumionen werden in weit höherer Konzentration als bei λ benötigt. Das Optimum liegt bei 40mM statt 1,8mM. Ohne Mg erfolgt keine Verpackung (Fig. 13). Da zweiwertige Ionen, vor allem Mg^{2+} , als Cofaktoren von Nukleasen wirken, könnte der große Mg-Bedarf ein Hinweis darauf sein, daß zumindest in vitro ungewöhnlich viele Nukleasereaktionen während der Reifung und Verpackung ablaufen. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, daß in meinem Ansatz für jedes verpackte Molekül zwei Schnitte, die Anfang und Ende des Moleküls bilden, erfolgen müssen, da die aus infizierten end⁻-Zellen gewonnene DNS so kurz ist. Im Unterschied dazu bildet bei sequentieller in vivo-Verpackung von längeren Konkatemeren ein Endschnitt jeweils den Anfang des nächsten Moleküls. Es ist also pro verpacktem Molekül nur ein Schnitt nötig. Es wurde nicht geprüft, ob die Verpackung reifer DNS, bei der vermutlich kein Schnitt mehr erfolgen muß, ebenfalls ein so hohes Optimum für Mg^{2+} -Ionen hat. Poteete (1979) et al. beschreibt in einer nach Entwicklung unseres in vitro-Systems erschienen Arbeit ein Optimum von 20mM, also auch einen Wert, der weit über dem von λ liegt. Er verwendete in seinem Versuchsansatz einen am5-Extrakt als DNS-Donor. Es ist anzunehmen, daß in diesem relativ lange Moleküle erhalten bleiben, da keine Reinigungs-

schritte erforderlich sind wie bei der DNS-Präparation und nur die infizierten Zellen geöffnet werden. Daß Poteete dennoch einen großen Bedarf an Mg-Ionen feststellte, legt nahe, daß der oben genannte Grund hierfür nicht oder nicht allein verantwortlich sein kann.

Die Bestimmung der Kinetik der Phagenproduktion (Fig. 11) zeigte, daß die Bildung aller in einem Extraktgemisch entstehenden in vitro-Phagen bei einer Inkubationstemperatur von 34°C nach etwa 40 Minuten abgeschlossen ist. Für λ wurden 10 Minuten bei 37°C beschrieben (Hohn 1975). Poteete stellte nach 20 Minuten bei 35°C keine weitere Titerzunahme der in vitro-Phagen fest. Sowohl bei Poteete als auch bei meinen Experimenten steigt nach einer etwa zweiminütigen lag-Phase, in der keine in vitro-Phagen nachweisbar sind, der Titer gleichmäßig an. Nach 10 Minuten ist bei Poteete und mir die Hälfte des endgültigen Titers erreicht. Daß nach 20 Minuten nur noch eine geringe Zunahme der Phagenwerte zu beobachten ist, liegt vermutlich vor allem an einer Inaktivierung der verschiedenen an der Verpackung beteiligten Enzyme und möglicherweise einer irregulären Aggregation einiger Strukturproteine im Laufe der Zeit. So war festzustellen, daß Extrakte deutlich an Aktivität verloren, je länger sie vor einem Verpackungsversuch in 34°C inkubiert wurden oder auch nur länger als eine Stunde in Eis gehalten wurden.

Mit dem Versuchsansatz war es möglich, Kenntnisse über die P22-Reifung aus in vivo-Experimenten zu bestätigen und einige Details über die Funktionen der Genprodukte 2 und 3 zu klären. Hierzu wurden amber-Extrakte der zu untersuchenden Mutanten mit verschiedenen anderen amber-Extrakten kombiniert, DNS zugegeben und auf Verpackungsaktivität, d. h. Bildung von in vitro-Phagen geprüft.

Funktion von gp1

1⁻-Mutanten synthetisieren proheads, denen das gp1 fehlt, die DNS bleibt ungeschnitten und wird nicht verpackt. In vitro war es möglich, durch Mischen eines am1-Extrakts mit einem am5-Extrakt reife Phagen zu erhalten. Es entstanden sehr wenige, maximal 1×10^5 , in vitro-Phagen pro ml (Tab. 17). Diese Phagen enthielten DNS mit dem Genotyp der zugegebenen DNS 2·13·L. Allerdings war festzustellen, daß auch hin und wieder am1-Extrakte allein, ohne daß sie durch ein anderes Extrakt ergänzt wurden, also daß die am1-Extrakte allein bereits Verpackungsaktivität zeigten (Tab. 17c). Leakiness der Mutante führt offenbar dazu, daß in geringer Zahl verpackungsfähige, vermutlich gp1-haltige proheads gebildet werden, und diese dann in vitro DNS verpacken können. In 5 von etwa 25 Experimenten, in denen der am1-Extrakt alleine keine DNS verpackte, war aber durch Mischen mit einem am5-Extrakt in vitro-Phagen zu erhalten. Es ist nicht zu klären, warum das in diesen wenigen Versuchen möglich war, in anderen dagegen weder der am1-Extrakt noch Gemische aus am1- und am5-Extrakten Verpackungsaktivität zeigten. Es spielen möglicherweise Vorgänge in den Extrakten eine Rolle, die nicht bekannt und so auch nicht kontrollierbar sind. Da die Zahl der positiven Resultate (d. h. Verpackung mit einem am1-Extrakt allein geht nicht, aber in einem Gemisch von am1 und am5 ist sie möglich) so gering ist, ist nicht zu entscheiden, ob eine Komplementation von gp1-losen Köpfen durch einen anderen Extrakt (hier am5) tatsächlich möglich ist. Es ist nicht völlig auszuschließen, daß im Gemisch mit am5-Extrakt nicht doch verpackungsaktive proheads aus dem am1-Extrakt ohne Zutun des am5-Extrakts gefüllt wurden. Poteete et al. (1979) konnte in Versuchen mit einer Kombination aus am1 und am5-Extrakt, der bei ihm gleichzeitig als DNS-Donor diente, keine Verpackung finden. Er gibt allerdings nicht an,

wie oft er die Versuche wiederholte und ob er vielleicht in seltenen Fällen doch Verpackung feststellen konnte.

Falls tatsächlich 1⁻-proheads in vitro komplementierbar sind, ist dies offenbar ein seltenes Ereignis. Auch Zugabe reifer DNS, die im allgemeinen besser verpackt wurde als DNS aus end⁻-Infektionen, führte zu keiner Steigerung der Verpackungstiter. Limitierend müssen entweder die für Komplementation kompetenten proheads im 1⁻-Extrakt sein oder die Konzentration von aktivem gp1 im am5-Extrakt. Die erste Möglichkeit macht ein Versuch wahrscheinlich, in dem jeweils die Konzentration des einen Extraktes konstant gehalten wurde, die Konzentration des anderen dagegen durch Verdünnen mit Puffer variiert wurde (Fig. 10). Wurde die Konzentration vom am1-Extrakt konstant gehalten, stieg der Titer der in vitro-Phagen mit Zunahme der Konzentration des am5-Extraktes zwar zunächst, ab 1/10 der Höchstkonzentration erfolgte aber keine Titerzunahme mehr. Wurde dagegen am5 konstant gehalten und die Konzentration von am1 verändert, stieg der Titer der in vitro-Phagen bis zur halben Maximalkonzentration von am1 an.

Das gp1 wird offenbar sehr früh in den prohead eingebaut. Es hat, eingebaut in seiner korrekten Form in den pro-head, eine Funktion bei der Initiation oder dem Verlauf der DNS-Verpackung (Botstein et al. 1972; King et al. 1973). Wenn es im Kopf fehlt, bleibt die DNS ungeschnitten außerhalb der proheads. Eine am-Mutation in Gen 1 könnte zu verschiedenen prohead-Strukturen führen: Entweder wird ein am-Fragment eingebaut; da ihm aber z. B. eine Bindungsstelle für DNS und/oder den gp2-gp3-Komplex (siehe S.173) fehlt, ist das Reifen der DNS nicht möglich. Bei einer in vitro-Komplementation müßten die Fragmente durch intakte Moleküle ersetzt werden. Oder es entstehen proheads, denen eine gp1-ähnliche

Struktur gänzlich fehlt. Die "Lücken" würden in vitro dann mit gp1 aus dem am5-Extrakt gefüllt, und der pro-head dadurch zur Verpackung fähig. Bei der von mir verwendeten und mehreren anderen am1-Mutanten konnte Kreutinger (aus diesem Labor) in SDS-Polyacrylamid-Gelen kein am1-Fragment finden, was für eine Komplementation gp1-loser proheads sprechen würde.

Ein Grund für die sehr niedrigen Verpackungshäufigkeiten könnte sein, daß 1⁻-proheads ziemlich instabil sind und leicht gp8 verlieren, aus dem das core von P22 besteht (Poteete et al. 1979; Kreutinger-persönliche Mitteilung). In Verpackungsansätzen könnten wahrscheinlich nur solche proheads komplementiert werden, die gp8 enthalten. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß auch das Fehlen von gp8 in den proheads komplementiert werden kann.

Ähnlichen Phänotyp wie am1-Mutanten von P22 zeigen B⁻-Mutanten des Phagen λ (McClure, Gold 1973; Kaiser et al. 1975a). λ und P22 werden als verwandt betrachtet (Botstein et al. 1972; Botstein, Herskowitz 1974). Die genetischen Karten der beiden Phagen zeigen in einigen Bereichen große Ähnlichkeit. So haben die Gene von P22 die für Integration, Rekombination, Phagenrepressorsynthese, DNS-Synthese und Zellyse verantwortlich sind, gleiche Reihenfolge wie λ -Gene analoger Funktion (Botstein et al. 1972). Im Unterschied zu P22 ist die doppelsträngige DNS von λ jedoch nicht terminal redundant und circular permutiert, sondern endet mit 5' Einzelstrangenden, die 12 Nukleotide lang sind. Die Sequenz dieser Nukleotide an den beiden Enden des DNS-Moleküls ist zueinander komplementär. Jeder Phagenpartikel hat dieselben zueinander komplementären Enden (Hershey, Burgi 1965; Gellert 1967; Yarmolinski 1971; Davidson et al. 1971).

B⁻-Mutanten synthetisieren bis auf das Fehlen von gpB reife proheads, denen das core aus Genprodukt Nu3 fehlt, das im Reifungsprozess von λ vor Verpackung der DNS den prohead verläßt. GpB und das durch proteolytische Spaltung von B entstehende gpB^{*} sind wie gp1 von P22 ein Protein der Hülle, das im prohead und im reifen Kopf in geringer Stückzahl, nämlich 10 bis 12 Kopien, nachweisbar ist (Hendrix, Casjens 1975; Murialdo, Simionovitch 1972b; Ray, Murialdo 1975). Auch bei λ sind DNS-Konkatemere, die vermutlich nach dem rolling circle-Modus synthetisiert werden, Vorläufer der reifen DNS (Carter, Smith 1970; McClure et al. 1973; Skalka et al. 1972). Sie werden in B⁻-Mutanten weder verpackt noch geschnitten (Hendrix, Casjens 1975; Hehn et al. 1974). In vitro konnten B⁻-Extrakte mit keinem anderen Extrakt wie C⁻, E⁻ und Nu3⁻, komplementiert werden (Murialdo, Becker 1978a; Ray, Murialdo 1975). GpE ist das Hauptkopfpotein von λ (Buchwald et al. 1970; Casjens et al. 1970) und so ist eine Kombination B⁻ + E⁻ analog zu 1⁻ + 5⁻ bei P22. B⁻-proheads sind offenbar aberrante Strukturen, die nicht wieder aktiviert werden können.

Für gpB wird die Rolle eines Initiators der prohead-Bildung diskutiert. Ergebnisse aus elektronenoptischen Untersuchungen sprechen dafür, daß gpB an einer Ecke des proheads sitzt (Murialdo, Ray 1975) und nicht, was der Zahl nach auch denkbar wäre, die Proteinmoleküle über die Ecken des Kopfes verteilt sind. Untersuchungen der Ultrastruktur von leeren Köpfen zeigen eine Ecke, die sich durch Anhäufung einer Proteinsorte von den anderen unterscheidet. Diese Struktur fehlt in B⁻-Mutanten. Man stellt sich vor, daß gpB einen Ring aus 10 bis 12 Untereinheiten an einer Ecke des prohead bildet. Diese markiert sowohl die Stelle für den Eintritt der DNS als auch für die Bindung des Schwanzes. Es konnte an Schwän-

zen, die von den Phagenköpfen abgesprengt worden waren, gpB + B^{*} nachgewiesen werden (Tsui, Hendrix 1980). Für einen geregelten Aufbau des prohead könnte der Ring aus gpB Voraussetzung sein, indem er als Starter dient. Man fand in Infektionen mit B⁻-Mutanten neben gpB-losen proheads sogenannte polyheads und "Monsters". Diese Strukturen haben nicht die normale Oberflächenstruktur von intakten proheads und Köpfen (Howatson, Kemp 1975; Kemp et al. 1968; Murialdo, Siminovitch 1972a). Das legt nahe, daß sie durch Fehler in der Initiation wegen dem Fehlen des gpB entstanden. Bei Infektionen mit einer am1-Mutante von P22 konnten keine Monsters oder andere aberrante Strukturen gefunden werden. Elektronenoptische Bilder und Röntgenstrukturanalyse von 1⁻proheads machen wahrscheinlich, daß die Oberflächenstruktur der von 1⁺proheads gleicht (Earnshaw et al. 1976). Die Tatsache daß in Abwesenheit von gp1 bzw. gpB proheads entstehen, muß nicht heißen, daß gp1 und gpB nicht normalerweise als einer von mehreren Initiatoren der prohead-Bildung fungiert. Möglicherweise wirken auch andere Minorproteine, wie gp16 und gp20, die ebenfalls offenbar sehr früh in den prohead eingebaut werden, zusätzlich zu ihrer Funktion bei der Infektion einer Wirtszelle als Initiatoren. Hinweise, an welcher Stelle im Kopf diese Proteine sitzen, gibt es bisher nicht. Bei Fehlen von gp1 könnten diese allein eine korrekte Bildung der proheads einleiten. Gp1 könnte wie das anscheinend für gpB zutrifft im Normalfall den Kragen, an dem die Bodenplatte haftet, bilden.

Da der korrekte Einbau von gp1 bzw. gpB in den prohead Voraussetzung für DNS-Verpackung ist, könnten die beiden Proteine, außer als strukturelle Voraussetzung für das Einschleusen der DNS, auch notwendig sein für eine Bindung der Komplexe aus gp2 und gp3 bzw. gpNu1/gpA an den prohead und so die Verpackung der DNS initiieren.

Die beiden Genprodukte A und Nu1 entsprechen in ihrer Funktion und der Lage auf dem Chromosom den Genprodukten 2 und 3 von P22. Sie sind wie diese direkt an der Verpackung beteiligt und binden vermutlich die zu verpackende DNS (Becker, Gold 1978; Becker et al. 1977a; Poteete, Botstein 1979; Poteete et al. 1979).

Über gp1 gibt es bisher relativ wenig Befunde, so daß für eindeutige Aussagen abzuwarten bleibt, welche Resultate Untersuchungen, die seine Funktion in gereinigtem Zustand und sein eventuelles Vorhandensein als Fragment in 1⁻-proheads etc. betreffen, Fragen, die in unserem Labor von Kreutinger bearbeitet werden. Erst wenn mehr über gp1 bekannt ist, läßt sich auch endgültig entscheiden, ob 1⁻-proheads im in vitro-Verpackungsansatz, wie es nach meinen Versuchen aussieht, komplementierbar sind. Aus dem Vergleich mit λ erscheint es allerdings unwahrscheinlich, daß 1⁻-proheads nachträglich noch zu aktiven 1-haltigen proheads umgeformt werden können.

Funktion von gp2, gp3

2⁻ und 3⁻-Mutanten bilden im nichtpermissiven Wirt zwar intakte proheads, die DNS bleibt aber ungeschnitten und wird nicht verpackt. Beide Genprodukte sind in proheads oder reifen Köpfen nicht nachweisbar.

Über Sucrosegradienten isolierte 2⁻- und 3⁻-proheads lassen sich in vitro durch Zugabe von DNS und einem Extrakt, der gp2 und gp3 liefert zu reifen Phagen umwandeln (Tab. 18b, 19b). Für die Bildung intakter proheads, die DNS verpacken können, sind die beiden Proteine nicht nötig, was Befunde aus in vivo-Experimenten bestätigen, in denen gezeigt wurde, daß in 2⁻- und 3⁻-Infektionen proheads entstehen, die denen aus 2⁺- und 3⁺-Infektionen im Aussehen und in der Proteinzusammensetzung gleichen (King et al. 1973; Lenk et al. 1975). Es fällt allerdings auf, daß 3⁻-proheads besser verpacken als 2⁻-proheads

(Tab. 19b), ein Phänomen, das auch Poteete beobachtete (Poteete et al. 1979). Der Grund hierfür ist bisher völlig unklar.

Die beiden Proteine gp2 und gp3 werden während oder/und zu Beginn der DNS-Verpackung notwendig. Die Funktionen beider Produkte sind mit entsprechenden Extrakten komplementierbar (Tab. 18,19). 2⁻-Extrakte führen bei Zugabe von verschiedenen geprüften gp2-haltigen Extrakten zu erheblich mehr in vitro-Phagen als 3⁻-Extrakte. Dabei ist egal, ob der 2. Extrakt ebenfalls proheads enthält oder nicht; 5⁻- und 8⁻-Extrakte liefern mit 2⁻-Extrakten genauso gute Ergebnisse wie 1⁻-Extrakte, was allerdings nicht weiter verwunderlich ist, da ja 1⁻-Extrakte möglicherweise gar nicht komplementiert werden. Alle drei Extrakte komplementieren dagegen das Fehlen von gp3 schlecht. Auch bei Verpackung reifer DNS erhält man kaum bessere Ergebnisse, wohingegen in den Kombinationen mit 2⁻-Extrakten deutlich höhere Titer der in vitro-Phagen erzielt werden. Für die niedrigen Titer in den 3⁻-Komplementationen ist die Zahl der verfügbaren aktiven proheads sicher nicht allein verantwortlich, da eine bestimmte Konzentration von gereinigten 3⁻-proheads in Verpackungsversuchen genauso viele in vitro-Phagen liefert wie die sechsfache Konzentration von 2⁻-proheads (Tab. 19b). Gp2 wird von allen geprüften Extrakttypen in großer Menge beigesteuert, gp3 dagegen offenbar nicht in ausreichender Konzentration bzw. zu wenig in aktiver Form. Hierfür sind mehrere Gründe denkbar:

- Poteete stellte fest, daß bei der Isolierung des "gp2 gp3-Komplexes" die Aktivität von gp3 während des Reinigungsprozesses verloren geht (Poteete, Botstein 1979). Die Aktivität von gp2 bleibt dagegen erhalten und ist durch Zugabe des Komplexes zu 2⁻-Extrakten durch Bildung von in vitro-Phagen nachweisbar. Auch Versuche von Frau

Koch aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen die große Labilität von gp3. Es ist also möglich, daß gp3 bei der Extrakterstellung zum großen Teil zerstört wird. Aus welchem Grund gerade gp3 so anfällig ist, müßte noch geklärt werden.

- Außerdem ist zu bedenken, daß die DNS-Moleküle aus Infektionen von end⁻-Zellen, die der Verpackung als Substrat dienten zum großen Teil kaum länger als ein Phagen genom waren. Unter der Annahme, daß der in vitro-Ablauf die Vorgänge in der Zelle widerspiegelt, bedeutet das, daß für jedes verpackte Molekül ein pac-Schnitt und der Endschnitt erfolgt sein sollte, da hier nicht, wie für die in vivo-Verpackung angenommen wird, ein langes Konkatermer als DNS-Substrat dient, das nach der Verpackung des ersten Phagen noch bis zu 9 weitere DNS-Moleküle in sequentieller Folge ohne pac-Schnitt liefert (Botstein 1968; Tye et al. 1974a). Es ist denkbar, daß falls gp3 das Protein ist, das für die Erkennung der pac-Sequenz oder (auch) für den Schnitt bei pac verantwortlich ist, dieses Protein in meinem in vitro-Ansatz in zu geringer Konzentration vorhanden ist, um für jedes verpackte Molekül einen pac-Schnitt zu setzen. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, daß in vitro die pac-Sequenz gar nicht Voraussetzung zur Verpackung ist, sondern jedes Molekül von einem beliebigen Ende aus verpackt wird und nur der Endschnitt erfolgen muß.

Gegen einen vermehrten Bedarf an gp3 wegen der Kürze der DNS-Moleküle im in vitro-System, spricht aber, daß reife DNS, bei deren Verpackung vermutlich kein pac-Schnitt ablaufen muß (siehe unten), in 3⁻-Komplementationen wie bei Verpackung von DNS aus infizierten end⁻-Zellen zu recht niedrigen in vitro-Phagentitern führt. Das bedeutet, daß nicht bzw. nicht nur die beschriebene Funktion von gp3 limitierend sein kann son-

dern noch andere Funktionen, die es bei der Verpackung ausübt - beispielsweise Binden der DNS unabhängig von der Sequenz. Das würde in ein von Jarvik vorgeschlagenes Modell passen, das besagt, daß gp3 die pac-Stelle erkennt und besetzt und diese nicht verläßt, bis die gesamte DNS im Kopf verpackt ist und so auch an den Anfang des nun beginnenden Moleküls gelangt. Ein Molekül gp3 wandert auf diese Weise am Konkatermer entlang. Wenn die Bindung des Moleküls auch ohne folgenden pac-Schnitt notwendig ist, wäre für die Verpackung von reifer DNS genauso viel gp3 erforderlich wie für die Verpackung von überlanger DNS.

gp3 und gp2 scheinen beide mehrere Funktionen bei der Verpackung von DNS auszuüben. Das zeigt auch folgendes: Weder 2⁻- noch 3⁻-Extrakte verpacken reife DNS, ohne daß das fehlende Protein durch einen zweiten Extrakt zugefügt wird (Tab. 18, 19). Wenn der pac-Schnitt und der Schnitt am Ende des Moleküls die ausschließliche Aufgabe eines oder beider Proteine wäre, wäre dies aber zu erwarten. Die verschiedenen Funktionen beider Produkte sind offenbar komplementierbar, wenn auch die von gp3 nicht so gut wie die des gp2 (Tab. 18, 19)

Poteete postuliert, daß gp2 und gp3 bei der DNS-Verpackung zumindest bei einem Schritt als Komplex funktionieren. Er konnte einen Komplex aus gp2 und einem Protein, das das Molekulargewicht von gp3 hat, isolieren (Poteete, Botstein 1979). 2⁻-Extrakte lassen sich aber sehr gut auch von einem 3⁻-Extrakt komplementieren, wobei gp2 und gp3 in keinem der beiden Extrakte als Komplex vorliegen können, das ist nur in 5⁻, 8⁻- und 1⁻-Extrakten möglich. Das heißt, daß der Komplex entweder in vitro gebildet werden und arbeiten kann, oder aber seine Bildung nicht nötig ist.

Es ist denkbar, daß gp3 verschiedene Funktionen unabhängig von der Verpackung ausübt, eine frühere, die im 2⁻-Extrakt bereits (in vivo) abgelaufen ist und (eine) weitere, die in vitro komplementierbar ist. Eine struktu-

relle Labilität, die sich durch Schädigung des Proteins bei Isolierung über Säulen, wie sie Poteete feststellte, zeigt, betrifft möglicherweise nur die frühere Funktion. Wenn gp3 eine Funktion ausübt, bevor es in der Verpackung aktiv wird, könnte diese die DNS betreffen. So stellte Poteete fest, daß 3⁻-DNS-Donorextrakte nicht zu komplementieren waren (Poteete, Botstein 1978). Als Voraussetzung für erfolgreiche Verpackung wäre denkbar, daß die DNS durch gp3 in irgendeiner Weise modifiziert oder aber mit Einzelstrangbrüchen versehen wird. So ist z. B. für λ bekannt, daß beim Verpackungsprozess dieses Phagen durch eine Nuklease, gpA, Einzelstrangbrüche in einem Bereich der DNS, der cos genannt wird, gesetzt werden (Becker, Gold 1975, 1978; Sternberg, Weisberg 1977b). Versuche mit DNS aus end⁻-Infektionen mit 3⁻L und aus reifen 3⁻L-Phagen (also 3⁻-DNS) machen das aber unwahrscheinlich. Diese DNS wird genauso gut verpackt wie 2⁻-DNS (Tab. 20). Da die verwendete am3-Mutante sehr "leaky" ist, ist allerdings nicht auszuschließen, daß noch genügend aktives gp3 gebildet wird, um die DNS zur Verpackung vorzubereiten bzw. zu aktivieren.

Ergebnisse zur DNS-Verpackung beim Phagen λ zeigen große Ähnlichkeit mit P22. Es gibt Mutanten, die den gleichen Phänotyp aufweisen wie am2- und am3-Mutanten. A⁻- und Nu1⁻-Mutanten bilden wie diese leere intakte proheads; die DNS, die auch bei λ als Konkatermer vorliegt, wird nicht verpackt und zu Phagenchromosomlänge gekürzt (Becker, et al. 1977 a,b; Kaiser et al. 1975; Weisberg et al. 1979). Extrakte dieser Mutanten können komplementiert werden, wenn mit Mg²⁺, Spermidin und ATP ergänzt wird, was auch bei Komplementation von 2⁻- und 3⁻-Extrakten nötig ist. Im reifen prohead und reifen Phagen sind beide Proteine wie auch gp2 und gp3 nicht nachweisbar (Becker et al. 1977b; Murialdo, Siminovitch 1972a). Sie betreffen die Initiation der Verpackung und das Schneiden der DNS.

Für gpA ist ziemlich sicher, daß es die Nuklease ist, die gemeinsam mit einigen unbekannten Wirtsfaktoren auf der DNS im Abstand von 12 Nukleotiden auf den beiden DNS-Strängen je einen Einzelstrangbruch (nick) in der cos-Region setzt (Becker, Gold 1975, 1978; Sternberg, Weisberg 1977a; Becker et al. 1977b; Feiss et al. 1979). Werden die Stränge getrennt, entstehen die für λ typischen Einzelstrangenden, die 12 Nukleotide umfassen und auf Grund ihrer Entstehungsweise komplementäre Sequenz haben. Die Sequenz ist für jedes Molekül gleich, da sie durch cos bestimmt ist. Das Schneiden der DNS an cos wird als ter-Reaktion bezeichnet. Sie stellt sowohl den Anfang als auch das Ende des DNS-Moleküls her. Das jeweilige Ende des ersten Moleküls liefert den Anfang des nächsten, das von einem Konkatermer verpackt wird. Es gibt Hinweise, daß gpA während der Verpackung spezifisch an DNS bindet.

Bei λ bildet eine sequenzspezifische Nuklease also beide Enden der Moleküle, wohingegen für P22 zwei unterschiedliche Reaktionen anzunehmen sind, entweder durch die Aktion einer sequenzspezifischen und einer unspezifischen Nuklease oder durch eine unspezifische Nuklease z. B. gp2 und einem Protein, das die pac-site erkennt, vermutlich gp3, und damit den ersten Schnitt auf dem Konkatermer an oder neben pac einleitet, möglicherweise durch Bindung der Nuklease in einem Komplex, z. B. gp2/gp3. Feiss et al. (Feiss et al. 1979; Feiss, Siegele 1979) konnten zeigen, daß bei λ die Funktion der Nuklease getrennt von der Erkennung einer bestimmten Sequenz erfolgt, möglicherweise durch gpNu1. Zwei lambdoide Phagen λ und 21, die sich in der Basenpaarfolge außerhalb des cos-Bereichs unterscheiden, können sich, was die Verpackung betrifft, nicht komplementieren. Sie haben unterschiedliche Verpackungsspezifität.

Verpackung reifer DNS

Alle positiven Extraktkombinationen verpacken reife DNS. Die Zahl der zu erhaltenden in vitro-Phagen ist sogar relativ hoch. Jedes 500ste Molekül wird im günstigen Fall verpackt (Tab. 24, Fig. 21, 22). Ein Vergleich mit der Verpackungshäufigkeit von DNS-Konkatemeren ist nicht möglich, da diese DNS aus Phagen- und Bakterien-DNS besteht und außerdem der Anteil an Phagen-DNS von mindestens einer Genomlänge unbekannt ist und bei den einzelnen DNS-Präparationen sicher sehr variiert.

Es ist anzunehmen, daß nur solche Moleküle als Substrat verwendet werden, die mit den pac-Sequenzen beginnen. Das sind bei einer Phagenpopulation etwa 30% aller Moleküle. Ob tatsächlich nur solche Moleküle verpackt werden, konnte allerdings nicht geklärt werden, da bei dem entsprechenden Experiment keine ausreichend hohe ^{32}P -Markierung erreicht werden konnte und die markierte DNS schlecht verpackt wurde (siehe IV.2.3).

Es ist denkbar, daß DNS nach einer Nick Translation-Prozedur so stark geschädigt ist, daß sie den Anforderungen bei der Verpackung nicht mehr genügt.

Da reife DNS verpackt wird, ist der pac-Schnitt also vermutlich nicht Bedingung zur Initiierung der Verpackung von DNS. In vitro reicht entweder das Vorhandensein entsprechender Sequenzen am Anfang eines Moleküls aus oder die Verpackung kann unabhängig von der Sequenz beginnen. Es werden weit weniger als 30% der zugegebenen DNS verpackt (Tab. 24). Daraus ist zu schließen, daß außer der möglicherweise notwendigen pac-Sequenz am Anfang eines Moleküls noch ein anderes Kriterium die Auswahl der verpackungsfähigen Moleküle bestimmt. Da reife DNS verpackt wird, ist zur Reifung des

des Phagen auch der Schnitt am Ende des DNS-Moleküls offenbar nicht erforderlich. Sie läuft unabhängig davon zu Ende.

Wie P22-proheads können auch λ -proheads lineare reife DNS in vitro verpacken (Hohn 1975; Hohn et al. 1976). GpA/Nu1 ist hierfür notwendig, wie bei P22 gp2 und gp3. Das läßt auf eine weitere Funktion außer der ter-Reaktion schließen. Man stellt sich vor, daß gpA/Nu1 sowohl die DNS an der cos-site bindet als auch mit einem prohead einen assembly-Komplex eingeht. Das Protein bleibt bis zum Ende der Verpackung gebunden und übt dabei noch andere Funktionen beim Füllen der Köpfe aus (Becker et al. 1977 a,b). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für P22 vorstellbar. Versuche bei λ mit doppellysogenen E.coli-Zellen, in denen beide Prophagen eine cos-site rechts oder links trugen, zeigten, daß die DNS-Moleküle polar von links nach rechts ($A \rightarrow R$) verpackt wurden (Feiss, Bublitz 1975; Emmons 1974). Auch für P22 konnte gezeigt werden, daß die Verpackung in einer Richtung verläuft (Weaver, Levine 1978). Zur Initiierung der Verpackung ist bei λ eine cos-Sequenz Voraussetzung. Die Länge der verpackten DNS wird einerseits bestimmt durch das Auftreten einer zweiten cos-site, außerdem aber durch die Kopfgröße. Liegt eine zweite cos-Sequenz zu nahe an der ersten, wird sie nicht geschnitten. Versuche mit Deletionsmutanten zeigten, daß DNS, die bis 15% kürzer ist als normal, noch verpackt wird und eine Reifung des Phagen zuläßt (Feiss et al. 1979; Feiss, Siegele 1979; Sternberg, Weisberg 1977a; Weil et al. 1975).

Erfolgt der pac-Schnitt ohne Verpackung von DNS?

In vitro war es bei λ möglich, mit isoliertem gpA, das wahrscheinlich gpNu1 enthält, Einzelstrangbrüche auf Konkatermeren zu setzen (Becker et al. 1977 a,b; 1978; Hohn 1975). In vivo bedarf die ter-Reaktion aktiver pro-

heads (Becker et al. 1977b; Jackson, persönl. Mitteilung). Auch bei P22 scheint der pac-Schnitt in vivo nicht ohne proheads möglich zu sein. Hierzu wurde geprüft, ob Infektionen von end⁻-Zellen mit verschiedenen am-Mutanten freie pac-Enden liefern. Feststellbar ist das durch Auftreten der D-Bande nach elektrophoretischer Auftrennung der Eco RI-Fragmente der DNS aus solchen Infektionen. Wenn D nachweisbar wäre, hieße das, daß Schnitte an pac erfolgt sind. Sowohl bei am2- und am3-Mutanten als auch nach am1, am5- und am8-Infektionen war jeweils eine sehr schwache Bande im D-Bereich sichtbar (Fig. 34). Diese fragliche Bande war bei den Hybriden nicht erkennbar (Fig. 32,33). Da die bakterielle DNS nach Eco RI-Behandlung ebenfalls einige deutliche Banden liefert (Fig. 34), nach Jackson (persönliche Mitteilung) auch eine in der Höhe der D-Bande, war nicht zu entscheiden, ob die sichtbare Bande nach Phageninfektion (am-Mutation) vom Phagen oder den Bakterien stammt. Eine Bande der Größe A' war bei keiner der Mutanten zu finden. Das läßt den Schluß zu, daß eventuell gebildetes D nur durch einen Schnitt an der ersten pac-site auf dem Konkatemer (nächst dem origin of replication) entstanden sein kann. Schnitte an den folgenden pac-sites müßten ein F-Ragment mit einem Molekulargewicht von A' liefern (siehe C.VI.2.2.).

Für am1, am5- und am8-Infektionen konnte Jackson geringe Mengen von D nachweisen. Sie verwendeten ³²P-markierte DNS für die Eco RI-Behandlung und konnten so anschließend die Hybridisierbarkeit der Bande im D-Bereich mit P22-DNS zeigen. Sie stellten also einen Unterschied zwischen Infektionen mit am1, am5 und am8 und Infektionen mit am2 und am3 fest. In meinen Untersuchungen konnte ich keinen Unterschied für die verschiedenen Infektionen finden. Es ist aber denkbar, daß die von mir eingesetzt-

ten DNS-Konzentrationen auf den Gelen zu gering waren, um eindeutige Bilder zu erhalten.

"Kartierung" von L-P22-Hybriden

Um Informationen über den Verpackungsmechanismus des Phagen L und der L-P22-Hybride deren DNS Substrat für erfolgreiche Verpackung war, zu erhalten, wurde DNS dieser Phagen einer Analyse mit der Restriktionsnuklease Eco RI unterworfen (Fig. 28, Tab. 26). Auf diese Weise sollte u. a. geklärt werden, ob die untersuchten Phagen eine unterrepräsentierte Bande - entsprechend der D-Bande von P22 liefern, also eine pac-site haben (siehe unten).

Sowohl alle Hybride als auch L-DNS liefern eine D-Bande. L muß also eine "pac"-site besitzen, die in derselben Entfernung zu einer Eco RI-Schnittstelle liegt, wie bei P22 (Fig. 28, 31). Da 2·L und L dasselbe Bandenmuster bilden, ist wahrscheinlich, daß "pac" von L im selben Bereich wie pac von P22 liegt (Fig. 28, 36). Möglicherweise ist der größte Teil der DNS, die die Kopfregion betrifft, identisch mit P22. Auch die "pac-site" von L, die zur D-Bande führt, sollte mit der pac-Sequenz von P22 identisch sein, da L-DNS von den P22-Enzymen verpackt wird. Es wäre allerdings auch denkbar, daß an einer anderen Stelle Sequenzen, die pac von P22 gleichen, liegen, von denen aus in vitro verpackt wird. Zur Klärung müßten dazu in vitro-Phagen untersucht werden, die durch Verpackung markierter L-DNS entstanden sind. Verdau der DNS aus solchen Phagen mit Eco RI, Trennung der Fragmente durch Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie würde zeigen, ob die in vitro-Phagen eine Bande mit dem Molekulargewicht von D liefern oder eine neue.

Die Informationen, die bei diesen Untersuchungen gewonnen wurden, erlaubten außerdem eine Bestimmung der Anteile von L und P22 in den Rekombinanten und die Angabe der Fragmentfolge (Fig. 28, 36). Unklarheiten in den Eco RI-Bandenmustern konnten durch Analyse mit der Restriktionsnuklease Hind III aufgelöst werden. Die Untersuchung zeigte, daß einige Banden von L, 2·L und 3·L aus zwei verschiedenen Fragmenten ähnlichen Molekulargewichts gebildet werden (Fig. 29). Das gilt auch für die größte Bande von 2·13·L, was sich bei Verdau der entsprechenden Bande mit Sal I bzw. mit Hind III zeigte (Fig. 30). Durch Bestimmung der Molekulargewichte der Banden (Tab.26) und Vergleich der Eltern- und Hybridphagen miteinander konnte die Herkunft und die Reihenfolge der Fragmente aller Hybride und von L bestimmt werden, mit Ausnahme der Fragmente e, f, und g von L, da diese Banden im Bereich der c-Immunität bei allen Rekombinanten zu finden sind (Fig. 28, 36):

2·13·L und 5·13·L bestehen vorwiegend aus P22-DNS, 2·L und 3 L werden zum großen Teil aus L-DNS gebildet. Eine Zuordnung des L-Anteils zu einer genetischen Karte war nicht möglich, da eine solche für L nicht existiert. Der Phage L hat aber eine große Ähnlichkeit mit P22. Bedzek stellte bereits 1968 sehr ähnliche serologische Eigenschaften fest; sie zeigten, daß die Schwänze der beiden Phagen zumindest weitgehend aus denselben Proteinen bestehen müssen, bei P22 das gp9. Außerdem zeigen sie in elektronenoptischen Aufnahmen gleiche Morphologie und Größe (Bedzek, Amati 1967). Kahmann und Prell (1971) konnten nachweisen, daß die beiden Phagen funktionelle und lokale Analogie vieler Gene haben. Am-Mutationen in vielen Genen von P22 sind durch die Gene von L komplementierbar, so auch die in meinen Versuchen verwendeten am-Mutationen in den Kopfgenen. Bei Auftrennung der Kopfproteine von P22, Phage L und 3·L auf Polyacrylamid-Gelen

durch Kreutinger waren bei allen Phagen Proteine derselben Molekulargewichte zu finden. Nur gp16 fehlt bei L und 3·L. Proheads von 3·L enthalten Proteine mit dem Molekulargewicht von gp8 von P22 (Fig. 24). Die beiden Phagen L und P22 scheinen sich sehr zu ähneln, auch wenn Unterschiede im Eco RI-Muster bestehen und der Phage L eine andere Dichte (niedriger) hat als P22 (Fig. 25).

Verdau der verschiedenen DNS-Typen mit Hind III und die Messung von reifen 2·13·L- und 3·L-Molekülen im Elektronenmikroskop ließen eine Molekulargewichtsbestimmung der DNS der Hybride und L zu (Tab. 23, 28, 29). Für alle waren Werte zu erhalten, die dem Molekulargewicht von P22-DNS ($27,45 \times 10^6$) sehr ähnlich sind.

Anomalien im Eco RI-Schnittmuster

Die Bandenmuster der Hybride und L ließen deutlich Anomalien der Bandendichten erkennen, die durch densitometrische Messungen bestätigt und ungefähr quantitativ erfaßt werden konnten (Fig. 28a, 31; Tab. 30). Bande D ist bei allen schwächer als bei P22. Bande e (2,45) scheint überrepräsentiert, d unterrepräsentiert zu sein (deutlich bei L und 2·13·L, für 2 L nicht genau erfaßbar)

Bei 3·L und 5 13 L sind jeweils eine schwache diffuse Bande α' (8,3-8,8) zu erkennen, bei 2·13·L eine sehr schwach gefärbte α' mit dem Molekulargewicht $5,85 \times 10^6$ D. Die höhere Dichte von Bande e (2,45) ist möglicherweise durch die Entstehung einer "D"-Bande vom zweiten headful zu erklären. Das erste Molekül, das vom Konkatermer abgeschnitten wird, ist etwas länger als ein Genomsatz und endet also innerhalb des Fragments d (2,95). Ist die Überlappung etwa $0,5 \times 10^6$ D, entsteht beim Verdau der DNA aus Phagen des zweiten headful eine schwache Bande "D" = 2,45, die im Molekulargewicht mit e zusammenfällt. $0,5 \times 10^6$ D sind 1,85% des gesamten Molekulargewichts.

Dieser Wert würde etwa mit der von Jackson angenommenen Überlappung von 2-3% bei P22 übereinstimmen (Jackson et al. 1978b). Das Zutreffen dieser Erklärung würde voraussetzen, daß bei L und den L-P22-Rekombinanten der Schnitt am Ende des ersten Moleküls exakter gesetzt wird als bei P22 (siehe S.184).

Das Auftreten einer Bande α' mit einem Molekulargewicht von $8,3-8,8 \times 10^6$ D bei $5 \cdot 13 \cdot L$ und $\frac{3}{2} L$ und einer Bande a' mit dem Molekulargewicht von $5,85 \times 10^6$ D bei $2 \cdot 13 \cdot L$ Bande wäre durch Annahme einer zweiten pac-Sequenz auf dem L-Anteil, von der aus verpackt wird, zu erklären. Diese Sequenz müßte etwa $0,25 \times 10^6$ D entfernt von der Schnittstelle zwischen e f + g und α bzw. a auf dem Fragment α bzw. a von L, $2 \cdot L$ und $2 \cdot 13 \cdot L$ liegen. Beim Schnitt an dieser Stelle entstünde aus α ein Fragment von $8,65 \times 10^6$ D = α' und aus a ein Fragment von $5,85 \times 10^6$ D, das mit den Fragmenten b, c bei L und $2 \cdot L$ zusammenfällt und unsichtbar wird, da diese Bande sowieso schon aus zwei Fragmenten gebildet wird.

Die Bande D ist bei allen Hybriden und bei L schwächer als bei P22. Möglicherweise liegt der Grund hierfür darin, daß tatsächlich, wie oben ausgeführt von zwei verschiedenen pac-Sequenzen aus verpackt wird. Nicht jeder erste headful würde dann mit D bzw. pac-P22 beginnen. Es ist aber auch denkbar, daß L mehr DNS-Moleküle von einem Konkatermer verpackt als P22, bei dem ein Konkatermer im Durchschnitt etwa drei Moleküle liefert (Jackson et al. 1978b). Es würden auf diese Weise weniger Partikel entstehen, die DNS vom ersten headful enthalten.

Der Phage L ist auf Grund seiner großen Ähnlichkeit mit P22 und der möglichen Identität der pac-Region ein sehr geeignetes Objekt für die Untersuchung des Verpackungsprozesses, der dem von P22 wahrscheinlich stark ähnelt oder vielleicht sogar gleicht.

Verpackungsmodell für P22

Wenn man alle bisher in vivo und in vitro gewonnenen Ergebnisse über den Verpackungsmodus beim Phagen P22 betrachtet, kann man unter Hinzuziehung der λ -Vorstellungen, ein entsprechendes Modell für den Ablauf der Verpackungsschritte bei P22 entwickeln:

An Überlänge DNS, welche entweder durch Replikation oder Rekombination entsteht, wird an der pac-Sequenz eines der Proteine 2 oder 3 oder ein Komplex aus beiden gebunden. Gleichzeitig hat dieser Komplex noch eine Bindungsstelle für den prohead, möglicherweise für einen Ring aus gp1-Untereinheiten. Die Bildung des Komplexes und/oder der Schnitt an pac leitet die Verpackung ein. Der Schnitt selbst ist aber in vitro offenbar nicht Bedingung, wie oben gezeigt wurde (Tab. 24). Die DNS wird wie bei λ in einer Richtung verpackt, wie Weaver und Levine durch Untersuchungen mit lysogenen Salmonella-Zellen nachwiesen (1978). Sie beginnt beim ersten headful bei pac und verläuft über die Kopfgene in Richtung der Immunitäts- und Lysisgene (Jackson et al. 1978b; Weaver, Levine 1978). Wie diese Richtung bestimmt wird, ist völlig unklar. Die Proteine gp2 und gp3 bleiben, als Komplex oder einzeln, an der DNS bzw. am Kopf gebunden und treiben das Füllen des Kopfes voran. Hydrolyse von ATP ist dabei unerlässlich. Die DNS muß im Kopf auf engsten Raum kondensiert werden, was offenbar ein energetisch ungünstiger Prozess ist. Bei Isolierung von gp2 ist ATP notwendig, um seine Aktivität zu erhalten. Das läßt den Schluß zu, daß dieses Protein mit ATP während der Verpackung interagiert. Der zweite Schnitt auf der DNS erfolgt, wenn der Kopf gefüllt ist. Ob der pac-Schnitt schon zu Beginn der Verpackung oder ebenfalls erst jetzt erfolgt, ein Modell, das für λ anscheinend zutrifft, (Feiss, Siegele 1979) ist nicht zu entscheiden. Die Länge

der verpackten DNS wird also vermutlich nur durch die Kapazität des Kopfes bestimmt. Ob auch Moleküle verpackt werden, die kürzer als normal sind, und zu reifen Partikeln führen, ist nicht bekannt. Daß die Länge aber zumindest in einem begrenzten Umfang variieren kann bzw. sich bei jedem Phagenpartikel etwas unterscheidet, ist daran erkennbar, daß in einem Eco RI-Bandenmuster von P22-DNS keine zweite "D"-Bande (D-2%-Redundanz) auftaucht. Diese Bande müßte beim Schneiden aller Moleküle aus dem zweiten headful entstehen, wenn das Ende des ersten Moleküls immer an derselben Stelle läge. Der Abstand zum zweiten Schnitt scheint also in gewissen Grenzen variabel zu sein. Ob gp2 und gp3 oder nur eines der beiden Enzyme und wenn, welches für den Schnitt verantwortlich ist, ist bisher nicht klar.

E. Zusammenfassung

Es wurde ein System entwickelt, mit dem es möglich ist, den Ablauf der DNS-Verpackung in vitro zu untersuchen. Im Versuchsansatz werden zwei Extrakte aus nicht supprimierenden Zellen, die mit amber-Mutanten in Morphogeneseogenen infiziert und inkubiert wurden, gemischt und die zu verpackenden DNS, ATP, Spermidin und Magnesium zugegeben. Die in vitro entstandenen Phagen können auf einem entsprechenden Indikator selektiv nachgewiesen werden, da die DNS aus Infektionen von end⁻-Zellen mit P22amber-Lim-Rekombinanten stammt, die zu diesem Zweck gekreuzt wurden.

Während für die in vivo DNS-Verpackung angenommen wird, daß DNS-Konkatemere die Vorläuferstrukturen der reifen DNS sind, wird in vitro auch DNS aus reifen Phagen - P22,L,P22-L-Rekombinanten - verpackt. Dies ermöglicht es, im Standard-Verpackungsexperiment DNS aus reifen Phagen einzusetzen.

Mit Hilfe des in vitro-Ansatzes konnten einige Kenntnisse über die Funktionen der Genprodukte 1,2 und 3 gewonnen werden. Durch Analyse der DNS der verschiedenen P22-L-Hybride und des Phagen L mit der Restriktionsnuclease Eco RI konnten Informationen über den Verpackungsmodus von L, der dem von P22 offenbar stark ähnelt oder gleicht, gewonnen werden.

Außerdem wurden die Anteile von P22 und L in den Rekombinanten weitgehend bestimmt.

Literaturverzeichnis

Amati, P. (1968)

Evidence for two immunity regulator systems in temperate bacteriophage P22 and L

Vir. 36, 701 - 703

Arrand, J.; Myers, P.; Roberts, R. (1978)

A new restriction endonuclease from *Streptomyces albus* G
J. Mol. Biol. 118, 127 - 135

Asakura, S.; Eguchi, G.; Iino, T. (1968)

Unidirectional growth of *Salmonella* flagella in vitro

J. Mol. Biol. 35, 227 - 236

Backhaus, H.; Schmieger, H. (1974)

The origin of the DNA in a special class of generalized transducing particles of *Salmonella* phage P22

Mol. Gen. Genet. 131, 123 - 135

Becker, A.; Gold, M. (1975)

Isolation of the bacteriophage A-gene protein

PNAS 72, 581 - 585

Becker, A.; Gold, M. (1978)

Enzymatic breakage of cohesive end site of bacteriophage λ DNA : Terminase (ter) reaction

PNAS 75, 4199 - 4203

Becker, A.; Marko, M.; Gold, M. (1977) (a)

Early events in the in vitro packaging of bacteriophage λ DNA

Vir. 78, 291 - 305

Becker, A.; Murialdo, H.; Gold, M. (1977) (b)

Studies on an in vitro system for the packaging and maturation of phage λ DNA

Vir. 78, 277 - 291

Bedzek, M.; Amati, P. (1967)

Properties of P22 and a related *Salmonella* Phage:

I. General features and host specificity

Vir. 31, 272 - 278

- Black, L. (1974)
Bacteriophage T4 internal protein mutants :
Isolation and properties
Vir. 60, 166 - 179
- Botstein, D. (1968)
Synthesis and maturation of phage P22 DNA :
I. Identification of intermediates
J. Mol. Biol. 34, 621 - 641
- Botstein, D.; Chan, R.; Waddell, C. (1972)
Genetics of bacteriophage P22 :
II. Gene order and gene function
Vir. 49, 268 - 282
- Botstein, D.; Herskowitz, J. (1974)
Properties of hybrids between Salmonella phage P22 and coliphage
Nature (London) 251, 584 - 589
- Botstein, D.; Levine, M. (1968)
Intermediates in the synthesis of phage P22 DNA
Symp. Quant. Biol. 33, 659 - 667
- Botstein, D.; Waddell, C.; King, J. (1973)
Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage P22 :
I. Genes, proteins, structures and DNA maturation
J. Mol. Biol. 80, 669 - 695
- Boyd, J. (1950)
The symbiotic bacteriophages of Salmonella typhimurium
The Journal of Pathology and Bacteriology 62, 501
- Bronson, M.; Levine, M. (1971)
Virulent mutants of bacteriophage P22:
I. Isolation and genetic analysis
J. of Vir. 7, 559 - 568
- Bronson, M.; Levine, M. (1972)
Virulent mutants of phage P22:
II. Physical analysis of P22 virB-3 and its component mutations
Vir. 47, 644 - 655

Buchwald, M.; Murialdo, H.; Siminovitch, L. (1970)

The morphogenesis of bacteriophage λ :

II, Identification of the principal structural proteins

Vir. 42, 390 - 400

Burck, K.; Scraba, D.; Miller, R. (1979)

Electron microscopic analysis of partially replicated
bacteriophage T7 DNA

J. of Vir. 32, 606 - 613

Burgi, E.; Hershey, A. (1963)

Sedimentation rate as a measurement of molecular weight
of DNA

Biophys. J. 3, 309 - 321

Campbell, A. (1961)

Sensitive mutants of bacteriophage λ

Vir. 14, 22 - 32

Carter, B.; Smith, M. (1970)

Intracellular pools of bacteriophage λ desoxyribonucleic acid

J. Mol. Biol. 50, 713 - 718

Casjens, S.; Hohn, T.; Kaiser, A. (1970)

Morphological proteins of phage λ :

Identification of the major head protein as the product of
gene E

Vir. 42, 496 - 507

Casjens, S.; King, J. (1975)

Virus assembly (Review)

Ann. Rev. of Biochem. 44, 555 - 611

Chan, R.; Botstein, D. (1972)

Genetics of bacteriophage P22:

I. Isolation of prophage deletions which affect immunity to superinfection

Vir. 49, 257 - 267

Chisholm, R. ; Deans, R.; Jackson, E.; Jackson, D.; Ruttila, J. (1980)

A physical map of the bacteriophage P22 late region :

genetic analysis of cloned fragments of P22 DNA

Vir. 102, 172 - 189

- Cohen, F.; McCormick, F. (1979)
Polyamines and virus multiplication
Advances in Virus Research 24, 331 - 388
- Coppo, A.; Manzi, A.; Takahashi, H. (1973)
Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of E. coli
J. Mol. Biol. 76, 61 - 87
- Davidson, N.; Scybalski, W. (1971)
Physical and chemical characteristics of λ DNA
Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 45 - 82
- Davis, R.; Simon, M.; Davidson, N. (1971)
Methods in Enzymology, Vol. XXI, 413
- Deans, R.; Jackson, E. (1979)
Restriction endonuclease Hind III cleavage site map of
bacteriophage P22
Vir. 95, 359 - 372
- Dickson, R.; Barnes, S.; Eiserling, F. (1970)
Structural proteins of bacteriophage T4
J. Mol. Biol. 53, 461
- Dreiseikelmann, B.; Wackernagel, W. (1978)
The terminal redundant regions of bacteriophage T7 DNA. Their
necessity for phage production studied by the infectivity of
T7 DNA after modification by various exonucleases
Mol. Gen. Gen. 159, 321 - 328
- Earnshaw, W.; Casjens, S.; Harrison, S. (1976)
Assembly of the head of bacteriophage P22 :
X-ray diffraction from heads, proheads and related structures
J. Mol. Biol. 104, 387 - 411
- Earnshaw, W.; King, J. (1978)
Structure of phage P22 coat protein aggregates formed in the
absence of scaffolding protein
J. Mol. Biol. 126, 721 - 747
- Ebel-Tsipis, J.; Botstein, D.; Fox, M. (1972)
Generalized transduction by phage P22 in Salmonella typhimurium
I. Molecular origin of transducing DNA
J. Mol. Biol. 71, 433 - 448
- Edgar, R.; Lielausis, I. (1968)
Some steps in the assembly of bacteriophage T4
J. Mol. Biol. 32, 263 - 276

Edgar, S.; Wood, W. (1966)

Morphogenesis of bacteriophage T4 in extracts of mutant-infected cells

PNAS 55, 498 - 505

Emmons, S. (1974)

Bacteriophage λ derivatives carrying two copies of the cohesive end site

J. Mol. Biol. 83, 511 - 525

Epstein, R.; Bolle, A.; Steinberg, C.; Kellenberger, E.; Boy de la Tour, E.; Chevally, R.; Edgar, R.; Susman, M.; Denhardt, G.;

Lielausis, A. (1963)

Physiological studies of conditional lethal mutants of bacteriophage T4D

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 375 - 394

Feiss, M.; Bublit, A. (1975)

Polarized packaging of bacteriophage λ chromosomes

J. Mol. Biol. 94, 583 - 594

Feiss, M.; Fisher, R.; Siegele, D.; Nichols, B.; Donelson, J. (1979)

Packaging of bacteriophage λ chromosome :

A role for base sequences outside cos

Vir. 92, 56 - 67

Feiss, M.; Siegele, D. (1979)

Packaging of the bacteriophage λ chromosome :

Dependence of cos cleavage on chromosome length

Vir. 92, 190 - 200

Frankel, F.; Batcheler, M.; Clark, C. (1971)

The role of gene 49 in DNA replicating and head morphogenesis in bacteriophage T4

J. Mol. Biol. 62, 439 - 463

Fraenkel-Conrat, H.; Williams, R. (1955)

Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components

PNAS 41, 690

Fröhlich, B.; Powling, A.; Knippers, R. (1975)

Formation of concatemeric DNA in bacteriophage T7-infected bact

Vir. 65, 435 - 468

- Fujisawa, H.; Miyazaki, J.; Minagawa, T. (1978)
In vitro packaging of phage T3 DNA
Vir. 87, 394 - 400
- Gellert, M. (1967)
Formation of covalent circles of λ DNA by E. coli extracts
PNAS 57, 148 - 155
- Georgopoulos, C.; Hendrix, R.; Casjens, S.; Kaiser, A. (1973)
Host participation in bacteriophage λ head assembly
J. Mol. Biol. 76, 45 - 60
- Georgopoulos, C.; Hendrix, R.; Kaiser, A.; Wood, W. (1972)
Role of host cell in bacteriophage morphogenesis :
Effect of a bacterial mutation on T4 head assembly
Nature (London) 239, 38 - 41
- Hedgpeth, J.; Goodman, H.; Boyer, H. (1972)
DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease
PNAS 69, 3449 - 3452
- Hendrix, R.; Casjens, S. (1974)
Protein fusion : A novel reaction in bacteriophage λ head assembly
PNAS 71, 1451 - 1455
- Hendrix, R.; Casjens, S. (1975)
Assembly of bacteriophage heads :
Protein processing and its genetic control in petit λ assembly
J. Mol. Biol. 91, 187 - 199
- Hershey, A.; Burgi, E. (1965)
Complementary structure of interacting sites at the ends of
 λ DNA molecules
PNAS 53, 325 - 328
- Hiebert, E.; Bancroft, L.; Braken, C. (1958)
The assembly in vitro of some small spherical viruses, and
other nucleoproteins
Vir. 34, 492
- Hoffman, B.; Levine, M. (1975)
A phage P22 virion protein which performs an essential early
function : I. Analysis of 16⁻ts mutants
Vir. 16, 1536 - 1546
- Hoffman, B.; Levine, M. (1975)
A phage P22 virion protein which performs an essential early
function : II. Characterization of the gene 16 function
J. of Vir. 16, 1547 - 1559

Hohn,B. (1975)

DNA as substrate for packaging into bacteriophage λ in vitro
J. Mol. Biol. 98, 93 - 106

Hohn,T.; Flick,H.; Hohn,B. (1975)

Petit λ , a family of particles from coliphage λ infected cells

J. Mol. Biol. 98, 107 - 120

Hohn,B.; Murray,K. (1977)

Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage λ particles in vitro

PNAS 74, 3259 - 3263

Hohn,T.; Wurtz,M.; Hohn,B. (1976)

Capsid transformation during packaging of bacteriophage λ DNA

Phil. Trans. R. Soc., Lond. B 276, 51 - 61

Hohn,B.; Wurtz,M.; Klein,B.; Lustig,A.; Hohn,T. (1974)

Phage λ DNA packaging in vitro

Supramol. Struct. 2,302 - 317

Hosoda,J.; Cone,R. (1970)

Analysis of T4 phage proteins :

I. Conversion of precursor proteins into lower molecular weight peptides during normal capsid formation

PNAS 66, 1275 - 1281

Howatson,A.; Kemp,C. (1975)

The structure of tubular head forms of bacteriophage λ ;
relation to capsid structure of petit λ and normal λ heads
Vir. 67, 80 - 85

Hsiao,C.; Black,L. (1977)

DNA packaging and the pathway of bacteriophage T4 head assembly
PNAS 74, 3652 - 3656

Israel,V. (1967)

The production of inactive phage P22 particles following induction
Vir. 33, 317 - 322

- Israel, V. (1977)
E protein of bacteriophage P22
I. Identification and ejection from wild-type and defective particles
J. of Vir. 23, 91 - 97
- Israel, V.; Anderson, T.; Levine, M. (1967)
In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-plate parts
PNAS 57, 284 - 291
- Jackson, E.; Miller, H.; Adams, M. (1978) a)
Eco RI restriction endonuclease cleavage map of bacteriophage P22 DNA
J. Mol. Biol. 118, 347 - 364
- Jackson, E.; Jackson, D.; Deans, R. (1978) b)
Eco RI analysis of bacteriophage P22 DNA packing
J. Mol. Biol. 118, 365 - 388
- Jara, L.; Murialdo, H. (1975)
Isolation of nonsense mutants in the morphogenic region of the bacteriophage λ chromosome
Vir. 64, 264 - 268
- Jarvik, J.; Botstein, D. (1973)
A genetic method for determining the order of events in a biological pathway
PNAS 70, 2046 - 2050
- Kahman, R.; Prell, H. (1971)
Complementation between P22amber mutants and phage λ
Mol. Gen. Genet. 113, 363 - 366
- Kaiser, D.; Masuda, T. (1973)
In vitro assembly of bacteriophage λ heads
PNAS 70, 260 - 264
- Kaiser, D.; Syvanen, M.; Masuda, T. (1974)
Processing and assembly of the head of bacteriophage λ
Supramol. Struct. 2, 318 - 328
- Kaiser, D.; Syvanen, M.; Masuda, T. (1975)
DNA packaging steps in bacteriophage λ head assembly
J. Mol. Biol. 91, 175 - 186
- Katsura, J.; Kuhl, P.W. (1975)
Morphogenesis of the tail of bacteriophage λ
III. Morphogenetic pathway
J. Mol. Biol. 91, 257 - 273

- Kemp, C.; Howartson, A.; Siminovitch, L. (1968)
Electron microscope studies of mutants of bacteriophage λ :
I. General description and quantitation of viral products
Vir. 36, 490 - 502
- Kerr, C.; Sadowski, P. (1974)
Packaging and maturation of DNA of bacteriophage T7 in vitro
PNAS 71, 3545 - 3549
- Kikuchi, Y.; King, J. (1975)
Genetic control of bacteriophage T4 baseplate morphogenesis :
I. Sequential assembly of the major precursor, in vivo and
in vitro
J. Mol. Genetics 99, 645 - 673
- King, J. (1968)
Assembly of the tail of bacteriophage T4
J. Mol. Biol. 32, 231 - 262
- King, J.; Casjens, S. (1974)
Catalytic head assembling protein in virus morphogenesis
Nature (London) 25, 112 - 119
- King, J.; Laemmli, U. (1973)
Bacteriophage T4 tail assembly :
Structural proteins and their genetic identification
J. Mol. Biol. 75, 315 - 337
- King, J.; Lenk, E.; Botstein, D. (1973)
Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella
phage P22: II. Morphogenetic pathway
J. Mol. Biol. 80, 697 - 733
- King, J.; Mykolajewycz, N. (1973)
Bacteriophage T4 tail assembly :
Proteins of the sheath, core and baseplate
J. Mol. Biol. 75, 339 - 358
- Kurtz, M.; Champe, P. (1977)
Precursors of T4 internal peptides
J. of Vir. 22, 412 - 419

- Laemmli, U. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature (London) 227, 680 - 685
- Laemmli, U.; Favre, M. (1973)
Maturation of the head of bacteriophage T4 :
I. DNA packaging events
J. Mol. Biol. 80, 575 - 599
- Laemmli, U.; Molbert, E.; Showe, M.; Kellenberger, E. (1970)
Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4
J. Mol. Biol. 49, 99 - 113
- Laemmli, U.; Paulson, J.; Hitchins, V. (1974)
Maturation of the head of the bacteriophage T4
J. Supramol. Struct. 2, 276 - 301
- Laemmli, U.; Quittner, S. (1974)
Maturation of the head of bacteriophage T4 :
IV. The proteins of the core of the tubular polyheads and in vitro cleavage of the head proteins
Vir. 62, 483 - 500
- Lenk, E.; Casjens, S.; Weeks, J.; King, J. (1975)
Intracellular visualization of precursor capsids in phage P22 mutant infected cells
Vir. 68, 182 - 199
- Linquist, B. (1971)
Vegetative DNA of temperate coliphage P2
Mol. Gen. Genet. 110, 178 - 196
- Masker, W.; Kuemmerle, N.; Allison, D. (1978)
In vitro packaging of bacteriophage T7 DNA synthesized in vitro
J. of Vir. 27, 149 - 163
- MacHattie, L.; Gill, G. (1977)
DNA maturation by the "headful" mode in bacteriophage T1
J. Mol. Biol. 110, 441 - 467

McClure, S.; MacHattie, L.; Gold, M. (1973)

A sedimentation analysis of DNA formed in E. coli infected with phage λ mutants

Vir. 54, 1 - 18

McClure, S.; Gold, M. (1973)

Intermediates in the maturation of bacteriophage λ DNA

Vir. 54, 19 - 27

Mousset, S.; Thomas, R. (1969)

Ter, a function which generates the ends of the mature λ chromosome

Nature (London) 270, 364 - 366

Murialdo, H.; Becker, A. (1978) (a)

A genetic analysis of bacteriophage λ prohead assembly in vitro

J. Mol. Biol. 125, 57 - 74

Murialdo, H.; Becker, A. (1978) (b)

Head morphogenesis of complex double-stranded Desoxyribonucleic acid bacteriophages

Microbiol. Reviews 42, 529 - 576

Murialdo, H.; Ray, P. (1975)

Model for arrangement of minor structural proteins in head of bacteriophage λ

Nature (London) 257, 815 - 817

Murialdo, H.; Siminovitch, L. (1971)

The morphogenesis of bacteriophage λ :

III. Identification of genes specifying morphogenetic proteins

Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 711 - 723

Murialdo, H.; Siminovitch, L. (1972) (a)

The morphogenesis of bacteriophage λ :

IV. Identification of gene products and control of the expression of the morphogenetic information

Vir. 48, 785 - 823

Murialdo, H.; Siminovitch, L. (1972) (b)

The morphogenesis of bacteriophage λ :

V. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head

Vir. 48, 825 - 835

- Okada, Y.; Ohno, T. (1972)
Assembly mechanism of tobacco mosaic virus particle from
its ribonucleic acid and protein
Mol. Gen. Genet. 114, 205 - 213
- Old, R.; Murray, K.; Roizes, G. (1975)
Recognition sequence of restriction endonuclease III from
Haemophilus influenzae
J. Mol. Biol. 82, 331 - 339
- Poteete, A.; Botstein, D. (1979)
Purification and properties of proteins essential to DNA
encapsulation by phage P22
Vir. 95, 565 - 573
- Poteete, A.; Jarvik, V.; Botstein, D. (1979)
Encapsulation of phage P22 DNA in vitro
Vir. 95, 550 - 564
- Poteete, A.; King, J. (1977)
Function of two new genes in Salmonella phage P22 assembly
Vir. 76, 725 - 739
- Pruss, G.; Calendar, R. (1978)
Maturation of bacteriophage P2 DNA
Vir. 86, 454 - 467
- Pruss, G.; Goldstein, R.; Calendar, R. (1974)
In vitro packaging of satellite phage P4 DNA
PNAS 71, 2367 - 2371
- Pruss, G.; Wang, J.; Calendar, R. (1975)
In vitro packaging of covalently closed circular monomers
of bacteriophage DNA
J. Mol. Biol. 98, 465 - 478
- Raj, A.S.; Raj, A.Y.; Schmieger, H. (1974)
The genes involved in the formation of general transducing
particles in Salmonella phage P22
Mol. Gen. Genet. 135, 175 - 184
- Ramsay, N.; Ritchie, A. (1980)
A physical map of permuted genome of bacteriophage T1
Mol. Gen. Genet. 179, 669 - 675

Ray, P.; Murialdo, H. (1975)

The role of gene Nu3 in bacteriophage λ head morphogenesis
Vir. 64, 247 - 263

Rigby, P.; Dieckmann, M.; Rhodes, C.; Berg, P. (1977)

Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity
in vitro by nick translation with DNA polymerase I
J. Mol. Biol. 113, 237

Ritchie, D.; Joicey, D. (1978)

Formation of concatemeric DNA as intermediate in the replication of bacteriophage T1 DNA molecules
J. of Gen. Vir. 41, 609 - 622

Rhoades, M.; MacHattie, A.; Thomas, C. (1968)

The P22 bacteriophage DNA molecule :

I. The mature form

J. Mol. Biol. 37, 21 - 40

Roberts, R. (1977)

Restriction and modification enzymes and their recognition sequences

in: DNA insertion elements, plasmids and episomes, A. Bukhari; J. Shapiro; S. Adhya

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 757 - 768

Schmieger, H. (1970)

The molecular structure of the transducing particles of Salmonella phage P22. II. Density gradient analysis of DNA
Mol. Gen. Genet. 109, 323 - 337

Schmieger, H. (1972)

Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities

Mol. Gen. Genet. 119, 75 - 88

Schmieger, H.; Backhaus, H. (1973)

The origin of DNA in transducing particles in P22-mutants with increased transduction frequencies (HT-mutants)

Mol. Gen. Genet. 120, 181 - 190

Schumann, W.; Bade, E. (1977)

A Salmonella thyphimurium endonuclease that converts native DNA to fragments of about 8×10^5 Daltons

Gen. Microbiol. 101, 319 - 326

Sechaud, J.; Streisinger, G.; Emrich, J.; Newton, J.; Lanford, H.; Reinhold, H.; Stahl, M. (1965)

Chromosome structure in phage T4 :

Terminal redundancy and heterozygosis

PNAS 54, 1333 - 1339

Sedmak, J.; Grossberg, S. (1977)

A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250

Anal. Biochem. 79, 544 - 552

Showe, M.; Black, L. (1973)

Assembly core of bacteriophage T4 : an intermediate in head formation

Nature (London) 242, 70 - 75

Skalka, A.; Poonian, M.; Bartl, P. (1972)

Concatemers in DNA replication :

Electron microscopic studies of partially denatured intracellular λ DNA

J. Mol. Biol. 64, 541 - 550

Sternberg, N. (1973)

Properties of a mutant of E. coli defective in bacteriophage head formation (gro E)

II. The propagation of phage λ

J. Mol. Biol. 76, 25 - 44

Sternberg, N.; Weisberg, R. (1977) (a)

Packaging of phage λ DNA :

I. The role of the cohesive end site and gene A protein

J. Mol. Biol. 117, 717 - 732

Sternberg, N.; Weisberg, R. (1977) (b)

Packaging of coliphage λ DNA :

II. The role of the gene D protein

J. Mol. Biol. 117, 733 - 759

- Strätling, W.; Krause, E.; Knippers, R. (1973)
Fast sedimenting deoxyribonucleic acid in bacteriophage T7
infected cells
Vir. 51, 109 - 119
- Streisinger, G.; Edgar, R.; Denhardt, G. (1964)
Chromosome structure in phage T4 :
I. Circularity of the linkage map
PNAS 51, 775 - 779
- Streisinger, G.; Emrich, J.; Stahl, M. (1967)
Chromosome structure in phage T4 :
III. Terminal redundancy and length determination
PNAS 57, 292 - 295
- Susskind, M.; Botstein, D. (1978*)
Molecular genetics of bacteriophage P22
Microbiol. Rev. 42, 385 - 413
- Susskind, M.; Wright, A.; Botstein, D. (1971)
Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of
Salmonella typhimurium :
II. Genetic evidence for two exclusion systems
Vir. 45, 638 - 652
- Takano, T.; Kakefuda, T. (1972)
Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of
bacteriophage capsid
Nature (London) 239, 34 - 37
- Thomas, C.; Abelson, J. (1967)
The isolation and characterization of DNA from bacterio-
phage
In: Procedures in Nucleic Acid Research, Cantani, G.; Davies, D.
(eds), 553 - 561, Harper and Row, New York
- Tsugita, A.; Black, L.; Showe, M. (1975)
Protein cleavage during virus assembly : characterization
of cleavage in T4 phage
J. Mol. Biol. 98, 271 - 277

Tsui, L.; Hendrix, P. (1980)

Head-tail connector of bacteriophage λ

J. Mol. Biol. 142, 419 - 438

Tye, B. (1976)

A mutant of phage P22 with randomly permuted DNA

J. Mol. Biol. 100, 421 - 426

Tye, B.; Botstein, D. (1974)

Mechanism of DNA encapsulation

J. Suramol. Struct. 2, 225 - 238

Tye, B.; Chan, R.; Botstein, D. (1974) (a)

Packaging of an oversize transducing genome of Salmonella phage P22

J. Mol. Biol. 85, 485 - 500

Tye, B.; Huberman, J.; Botstein, D. (1974)

Non-random circular permutation of phage P22 DNA

J. Mol. Biol. 85, 501 - 528

Wake, R.; Kaiser, A.; Inman, R. (1972)

Isolation and structure of phage λ head-mutant DNA

J. Mol. Biol. 64, 519 - 540

Wallach, D.; Knüfermann, H. (Herausgeber, 1973)

Plasmamembranen - Chemie, Biologie und Pathologie

Springer Verlag: Berlin - Heidelberg - New York

Wang, J.; Kaiser, A. (1973)

The evidence that the cohesive ends of mature λ DNA are generated by the gene A product

Nature (London) 241, 16 - 17

Weaver, S.; Levine, M. (1978)

Replication in situ and DNA encapsulation following induction of an excision-defective lysogen of Salmonella bacteriophage P22

J. Mol. Biol. 118, 389 - 411

Weigle, J. (1966)

Assembly of phage λ in vitro

PNAS 55, 1462 - 1466

Weigle, J. (1968)

Studies on head-tail union in bacteriophage λ

J. Mol. Biol. 33, 483 - 489

Weil, J.; DeWein, N.; Casale, A. (1975)

Morphogenesis of λ with genomes containing excess DNA :

Functional particles containing 12 and 15% excess DNA

Vir. 63, 352 - 367

Weisberg, R.; Sternberg, N.; Gallay, E. (1979)

The Nu1 gene of coliphage λ

Vir. 95, 99 - 109

Worcel, A.; Burgi, E. (1972)

On the structure of the folded chromosome of E. coli

J. Mol. Biol. 71, 127 - 147

Yamagishi, M.; Fujisawa, H.; Yamagishi, H.; Minagawa, T. (1980)

Purification of gene 6 product of bacteriophage T3 and its role in in vitro DNA packaging

Yarmolinski, M. (1971)

The bacteriophage λ : Making joining ends

S. 97 - 111 , In: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York

Zum Abschluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Horst Schmieger für die intensive Beratung und stetige Diskussionsbereitschaft bei der Planung der Versuche sowie bei der Interpretation der Ergebnisse danken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Gessner für die Hilfe bei den elektronenoptischen Untersuchungen.

LEBENS LAUF

- 22.6.1949 geboren in Augsburg
- 1955 -1959 Besuch der Evangelischen Volksschule
in Göggingen bei Augsburg
- 1959 -1969 Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums
A.B. von Stettensches Institut in
Augsburg
- 1969 -1976 Studium der Fächer Biologie und
Chemie an der Ludwig Maximilian Uni-
versität in München
- Herbst 1976 1. Staatsexamen in Biologie und Chemie
- seit Jan. 1977 Doktorarbeit in Biologie am Genetischen
Institut in München unter Anleitung
von Herrn Prof.Dr. Horst Schmieger
- seit April 1981 angestellt bei der Firma Biosigma
in München

